



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
2012

**Ana Margarida  
Alves de Oliveira**

**Análise protetora de derivados de luteolina num  
modelo de Huntington**





**Ana Margarida  
Alves de Oliveira**

**Análise protetora de derivados de luteolina num  
modelo de Huntington**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Clínica realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Ana Cristina Carvalho Rego, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, da Doutora Susana Maria de Almeida Cardoso, Investigadora auxiliar do CERNAS, Escola Superior Agrária de Coimbra e do Professor Doutor Artur Manuel Soares da Silva, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro



## **O júri**

Presidente

**Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues**  
Professor auxiliar da Universidade de Aveiro

**Doutor Artur Manuel Soares da Silva**  
Professor catedrático da Universidade de Aveiro

**Doutora Ana Cristina Carvalho Rego**  
Professora auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

**Doutora Susana Maria de Almeida Cardoso**  
Investigadora auxiliar do CERNAS, Escola Superior Agrária de Coimbra

**Doutora Ildete Luísa Ferreira**  
Investigadora do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra



*Aos Meus Pais*





## Agradecimentos

À Professora Doutora Ana Cristina Rego, pela orientação científica desta tese. Por todos os excelentes conselhos, conhecimentos científicos e técnicos que me transmitiu ao longo do tempo. Agradeço também a disponibilidade, a atenção, o incentivo, o interesse com que sempre me recebeu, para qualquer dúvida a esclarecer. Gostaria ainda de agradecer a revisão desta dissertação, o espírito crítico e sobretudo pela sua amizade. Muito obrigada por tudo.

À Doutora Susana Cardoso, quero agradecer a amizade, o carinho, a preocupação e principalmente a disponibilidade que sempre demonstrou ao longo deste trabalho. Agradeço também os ensinamentos prestados com profissionalismo e competência, e pelo acompanhamento na execução prática deste trabalho, bem como a bibliografia cedida. Quero agradecer ainda, a revisão desta dissertação.

Ao Professor Doutor Artur Silva, pelos ensinamentos prestados com profissionalismo e competência, pela prontidão e disponibilidade demonstradas. Quero agradecer ainda a excelente orientação na revisão desta dissertação.

Ao Professor Doutor Pedro Domingues, coordenador do Mestrado em Bioquímica, pela disponibilidade e facilidades concebidas na realização deste projeto.

Agradeço a todos os membros do grupo *Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Neurodegeneration*, em especial à Luísa, à Tatiana, à Teresa, à Sandra, ao Márcio, à Rita, ao Mário, à Luana e à Sofia, pela amizade, companheirismo, e pelos excelentes conselhos técnicos oferecidos.

Aos alunos de mestrado, pelas horas passadas no laboratório, sempre com boa disposição, espírito de grupo e de ajuda, pela troca de ideias que nos permitiu solucionar alguns problemas técnicos. E essencialmente pela amizade.



Gostaria de agradecer às funcionárias e técnicas do Centro de Neurociências e Biologia Celular, pela colaboração prestada.

Ao meu pai, agradeço por tudo! Sem o seu suporte, apoio e esforço, esta realidade não seria possível.

Um agradecimento muito especial à minha Mãe, ainda que fisicamente ausente, sempre acreditou em mim, sempre me apoiou e me orientou nos meus objetivos de vida. Foram momentos muito difíceis mas senti sempre que estavas a meu lado. O meu sincero e eterno obrigada!

À minha irmã, pelo carinho, disponibilidade e boa disposição com que me recebe.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta Dissertação de Mestrado.



## Palavras-chave

Doença de Huntington, flavonoides, luteolina, stresse oxidativo, apoptose

## Resumo

A doença de Huntington (DH) é uma doença neurodegenerativa causada pela mutação no gene *HD* que codifica a proteína huntingtina, expressa em todas as células do organismo humano. Esta mutação resulta na alteração de múltiplos mecanismos intracelulares que conduzem à disfunção metabólica e mitocondrial, stresse oxidativo e morte celular por apoptose. No entanto, não existe uma terapêutica capaz de atenuar os processos neurodegenerativos característicos da doença. Assim, neste trabalho avaliou-se a atividade neuroprotetora de derivados da luteolina (3-alkil-3',4',5,7-tetra-hidroxi-flavonas, contendo cadeias alquila com 1, 4, 6 e 10 carbonos), através da análise da citotoxicidade, quantificação de peróxidos intracelulares, determinação da atividade da caspase-3 e avaliação dos níveis do rácio Bax/Bcl-2 e a proteína mitocondrial AIF, numa linha celular neuronal, *STHdh*, obtida do estriado de murganhos *knock-in* homozigóticos que expressam a mutação da huntingtina com 111 glutaminas (*STHdh*<sup>111/111</sup>) *versus* células normais que expressam a huntingtina *wild type* com 7 glutaminas (*STHdh*<sup>7/7</sup>), derivada de murganhos controlo.

A capacidade redutora das células *Q7* e *Q111* mostrou ser semelhante após tratamento com a luteolina e o *Lut-C1*. Quando as células foram tratadas com *Lut-C4*, *Lut-C6* e *Lut-C10* o mesmo efeito só foi verificado após a exposição a concentrações superiores (10 e 25  $\mu$ M). Nas concentrações testadas, os compostos não induziram alterações significativas da integridade membranar nas células. Por outro lado, após tratamento com *Lut-C4*, *Lut-C6* e *Lut-C10* a 25  $\mu$ M, as células *Q7* e *Q111* apresentaram menor produção de peróxidos intracelulares. Ainda, os compostos *Lut-C4* e *Lut-C6* (10 e 25  $\mu$ M) reduziram de forma mais significativa a atividade da caspase-3 nas células mutantes. Contudo, verificou-se que a redução da atividade da caspase-3 induzida por luteolina (0,1  $\mu$ M) e *Lut-C6* (10 e 25  $\mu$ M) nas células mutantes não está associada à alteração do rácio Bax/Bcl-2.

Em geral, os resultados sugerem que a luteolina e as 3',4',5,7-tetra-hidroxi-flavonas com cadeias alquila de 4 e 6 carbonos podem ser relevantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a DH, pela via apoptótica. No entanto, o mecanismo de atuação dos derivados 3-alkil-luteolina, assim como a sua biodisponibilidade ainda é não conhecido, pelo que este estudo deverá ser aprofundado no futuro através da utilização de outros métodos de avaliação.



## Keywords

Huntington's disease, flavonoids, luteolin, oxidative stress, apoptosis

## Abstract

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disorder, caused by a mutation in the *HD* gene encoding for huntingtin protein, expressed in all cells. This mutation results in alteration of multiple intracellular mechanisms leading to metabolic and mitochondrial dysfunction, oxidative stress and cell death by apoptosis. However there is no effective treatment to attenuate the neurodegenerative processes characteristic of this disease. Thus, in this study the neuroprotective activity of luteolin derivatives (3-alkyl-3',4',5,7-tetrahydroxyflavones containing alkyl chains with 1, 4, 6 and 10 carbons) was evaluated, through the analysis of cytotoxicity, quantification of intracellular peroxides, measurement of caspase-3 activity and assessment of ratio Bax/Bcl-2 and AIF mitochondrial protein, in a neuronal cell line, STHdh obtained from the striatum of knock-in homozygous mice expressing mutant huntingtin with 111 glutamines (STHdh<sup>111/111</sup>) versus normal cells expressing wild-type huntingtin with 7 glutamines (STHdh<sup>7/7</sup>), derived from control mice.

The reduction capacity profile of the cells Q<sub>7</sub> and Q<sub>111</sub> was similar for luteolin and Lut-C1. When cells were treated with Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> and Lut-C<sub>10</sub>, the same effect was only observed after exposure to higher concentrations (10 and 25 µM). In the tested conditions, no cell membrane injury was observed, as measured by LDH release assay. In turn, after the treatment with Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> and Lut-C<sub>10</sub> (25 µM), Q<sub>7</sub> and Q<sub>111</sub> cells showed lower intracellular peroxides. Moreover, the compounds Lut-C<sub>4</sub> and Lut-C<sub>6</sub> (10 and 25 µM) decreased more significantly the activity of caspase-3 in mutant cells. However, it was found that reduction of caspase-3 activity induced by luteolin (0.1 µM) and Lut-C6 (10 and 25 µM) in mutant cells is not associated with the change ratio Bax/Bcl-2.

Overall, the present results suggest that luteolin and the 3-alkyl-3',4',5,7-tetrahydroxyflavones bearing alkyl chains of 4 and 6 carbons may be relevant for the development of new therapeutic strategies for HD, by targeting the apoptotic pathway. However, the mechanism of action of 3-alkyl derivatives luteolin and its bioavailability is still not known, so this study should be further developed in the future by using other methods.





# ÍNDICE

	Índice	xvii
	Índice de figuras	xxiii
<b>Capítulo I</b>	<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>31</b>
	1.1 Doença de Huntington (DH)	31
	1.1.1 Neuropatologia da DH	32
	1.1.2 Genética da DH	33
	1.1.3 Proteína huntingtina (Htt)	34
	1.1.4 Modelos animais que expressam a proteína Htt mutante	35
	1.1.5 Tratamento da DH	36
	1.2 Apoptose	37
	1.2.1 Vias de ativação da apoptose	38
	1.2.2 Caspases	40
	1.2.3 Proteínas da família Bcl-2	41
	1.2.4 Apoptose & doença de Huntington	42
	1.3 Stresse oxidativo	43
	1.3.1 Stresse oxidativo & doença de Huntington	45
	1.3.2 Antioxidantes	46
	1.4 Flavonoides	49
	1.4.1 Estrutura química dos flavonoides	49
	1.4.2 Flavonas	51
	1.4.3 Luteolina-ação protetora	52
	1.4.4 Derivados de luteolina com cadeias 3-alquilo	54
	1.5 Objetivos	55



<b>Capítulo II</b>	<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>59</b>
	2.1 Materiais	59
	2.2 Culturas celulares	59
	2.2.1 Avaliação do poder redutor pelo método MTT	60
	2.2.2 Avaliação do poder redutor da resusarina	61
	2.2.3 Quantificação da liberação de LDH	62
	2.2.4 Quantificação de peróxidos intracelulares	63
	2.2.5 Avaliação da atividade da caspase-3	64
	2.2.6 Quantificação da proteína pelo método Bio-Rad	65
	2.2.7 <i>Western blotting</i>	66
	2.2.7.1 Recolha de extratos totais	66
	2.2.7.2 Recolha de extratos mitocondriais	66
	2.2.7.3 Anticorpos primários e secundários	67
	2.2.7.4 Eletroforese, transferência e revelação das membranas	67
	2.3 Análise estatística	67
<b>Capítulo III</b>	<b>3. RESULTADOS</b>	<b>71</b>
	3.1 Efeito da luteolina e dos seus derivados 3-alquilo na capacidade redutora das células	71
	3.2 Efeito da luteolina e dos seus derivados 3-alquilo na liberação de LDH	78
	3.3 Efeito da luteolina e dos seus derivados 3-alquilo nos níveis de peróxidos intracelulares	80
	3.4 Efeito da luteolina e dos seus derivados 3-alquilo na avaliação da atividade da caspase-3	82
	3.5 Efeito da luteolina e dos seus derivados nas proteínas apoptóticas	84



<b>Capítulo IV</b>	4. DISCUSSÃO	89
	4.1 STHdh <sup>7/7</sup> e STHdh <sup>111/111</sup> em condições basais	90
	4.2 Efeitos da luteolina e dos derivados 3-alquil-luteolina nas células STHdh <sup>7/7</sup> e STHdh <sup>111/111</sup>	92
	4.3 Principais dificuldades e propostas para trabalho futuro	96
<b>Capítulo V</b>	5.1 CONCLUSÃO	101
<b>Capítulo VI</b>	6. BIBLIOGRAFIA	105



## Índice de figuras

Figura 1 .....	32
Figura 2 .....	33
Figura 3 .....	40
Figura 4 .....	44
Figura 5 .....	47
Figura 6 .....	49
Figura 7 .....	50
Figura 8 .....	52
Figura 9 .....	52
Figura 10 .....	55
Figura 11 .....	63
Figura 12 .....	72
Figura 13 .....	73
Figura 14 .....	74
Figura 15 .....	75
Figura 16 .....	76
Figura 17 .....	77
Figura 18 .....	80
Figura 19 .....	81
Figura 20 .....	83
Figura 21 .....	85
Figura 22 .....	86

## Índice de tabelas

Tabela 1 .....	65
----------------	----





## Lista de abreviaturas

AB	Alamar <i>blue</i>
AIF	Fator indutor da apoptose
AKT	Do inglês “V-akt murine thymoma viral oncogene homolog”
Apaf-1	Fator de ativação de protease associada à apoptose-1
ATP	Adenosina trifosfato
Bad	Do inglês “Bcl-2 Associated Death promoter”
Bak	Do inglês “Bcl-2 Antagonist Killer”
Bax	Do inglês “Bcl-2 Associated X protein”
Bcl-2	Do inglês “B-cell lymphoma 2”
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
Bid	Do inglês “Bcl-2 Interacting Domain”
Bik	Do inglês “Bcl-2 Interacting Killer”
Bim	Do inglês “Bcl-2 Interacting Mediator”
Bok	Do inglês “Bcl-2 Ovarian Killer”
Blvrd	Biliverdina redutase B
CAG	Citosina- Adenina-Guanina
CAT	Catalase
CoQ10	Coenzima Q10
DCFH <sub>2</sub> -DA	Diacetato de 2',7'-diclorodi-hidrofluoresceína
DFF	Do inglês, “DNA fragmentation factor”
DFF40/CAD	Do inglês “caspase-activated DNase”
DFF45/ICAD	Do inglês “inhibitor of CAD- caspase-activated DNase”
DH	Doença de Huntington
DIABLO	Do inglês “Direct IAP-binding protein with low pI”
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FADD	Fas associado ao domínio de morte



GABA	Ácido gama-aminobutírico
GCL	Glutamato cisteína ligase
GPx	Glutational peroxidase
GR	Glutational redutase
GSH	Glutational (forma reduzida)
GSSH	Glutational (forma oxidada)
Htt	Huntingtina
IAP	Proteínas inibidoras da apoptose
IL-6	Interleucina-6
JNK	Do inglês “ <i>c-jun-N-terminal kinases</i> ”
LDH	Lactato desidrogenase
MAP	Do inglês “Mitogen-activated protein”
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazólio
NADH	Do inglês “Nicotinamide adenine dinucleotide”
NADPH	Do inglês “Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate”
NF-kB	Do inglês “Nuclear factor kappa activated B cells”
PI-3k	Fosfatidilinositol 3-cinase
Poly(Q)	Poliglutaminas
PUMA	Do inglês “p53 upregulated modulator of apoptosis”
RNS	Espécies reativas de nitrogénio (do inglês “reactive nitrogen species”)
ROS	Espécies reativas de oxigénio (do inglês “reactive oxygen species”)
S.E.M.	Do inglês “Standard error of the mean”
SMAC	Do inglês “Second mitochondria-derived activator of caspases”
SOD	Superóxido dismutase
TNF	Fator de necrose tumoral
WT	Do inglês “Wild type”



# Capítulo I

---

## Introdução



## **1. Introdução**

### **1.1 Doença de Huntington (DH)**

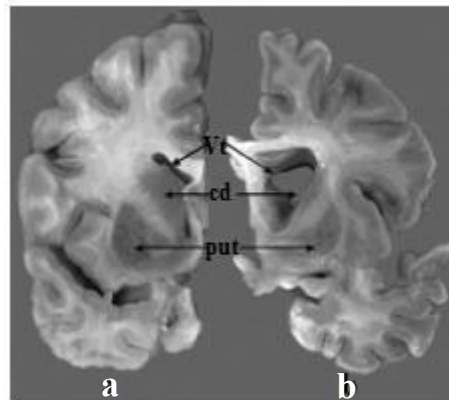
A doença de Huntington (DH), também designada por Coreia de Huntington, a palavra grega “khoreia” significa dança, [1] é uma doença neurodegenerativa, autossómica dominante, caracterizada por uma perda progressiva de neurónios GABAérgicos no estriado [2]. Os primeiros sintomas, características clínicas e o padrão de transmissão familiar desta patologia foram descritos por George Huntington [1, 3]. A DH apresenta maior prevalência no oeste Europeu e América do Norte, com incidência de 1 indivíduo por cada 10000 [1]. Em Portugal, de acordo com a associação portuguesa de doentes de Huntington, existem 1200 doentes e um número bastante significativo de pessoas em risco de desenvolver a doença [4].

Clinicamente, a DH caracteriza-se por coreia progressiva, distúrbios comportamentais e perturbações psiquiátricas [1, 5]. Os primeiros sinais da doença são subtis. Numa primeira fase podem ser observadas algumas alterações no movimento, irritabilidade, depressão e as alterações do movimento progridem de forma mais lenta ao longo da doença. Os movimentos involuntários dos músculos aparecem numa fase mais avançada da doença e num estado ainda mais avançado, a doença pode ser caracterizada por demência, convulsões e rigidez dos músculos [6]. Com menor frequência, os doentes podem ter perda de peso corporal e alteração do ritmo circadiano [1, 7]. Os sintomas da DH têm normalmente início entre os 35 e os 50 anos de idade. No entanto, em alguns casos, os sintomas podem surgir por volta dos 20 anos de idade com distúrbios de comportamento e dificuldades de aprendizagem [1, 3]. Estudos revelam que a duração média da doença é de 17 a 20 anos e que a sua progressão leva a uma maior dependência na vida diária, até surgir a morte [1]. A morte dos indivíduos portadores da doença surge, geralmente, devido a complicações respiratórias infecciosas e cardiovasculares [8].

Tendo em conta os sintomas característicos da doença, os critérios usados para o diagnóstico da DH são: a) a análise da história familiar de DH, b) deficiência motora progressiva associada à coreia e rigidez sem causa conhecida, e c) alterações psiquiátricas com demência progressiva, sem causa conhecida [9]. Os indivíduos que apresentam estes sintomas são geralmente submetidos a um teste genético, de forma a avaliar a presença da mutação associada à DH.

### **1.1.1 Neuropatologia da DH**

O estriado, formado pelo núcleo caudado e pelo putâmen, é uma das áreas cerebrais mais afetadas na DH, sendo esta doença neuropatologicamente caracterizada pela atrofia gradual desta área (Figura 1) [9, 10]. A doença é classificada em cinco estádios, de acordo com a severidade neuropatológica e do número de repetições CAG, uma vez que geralmente o aumento do número de repetições CAG é proporcional à lesão celular no estriado [9]. O grau de atrofia estriatal está também relacionado com a degeneração de outras estruturas cerebrais que não a do estriado. Além disso, pensa-se que em casos mais severos, o peso cerebral pode diminuir até 40%, devido à atrofia cerebral característica da doença [7].



**Figura 1 – Secções de um hemisfério cerebral de um doente de Huntington (b) e de um hemisfério cerebral controlo (a).** Na condição de doença verifica-se uma perda de substância branca no núcleo caudado (cd), putâmen (put) e córtex (Vt: ventrículo lateral)  
(Adaptado de Ersoy *et al.*, 2007 [11]).

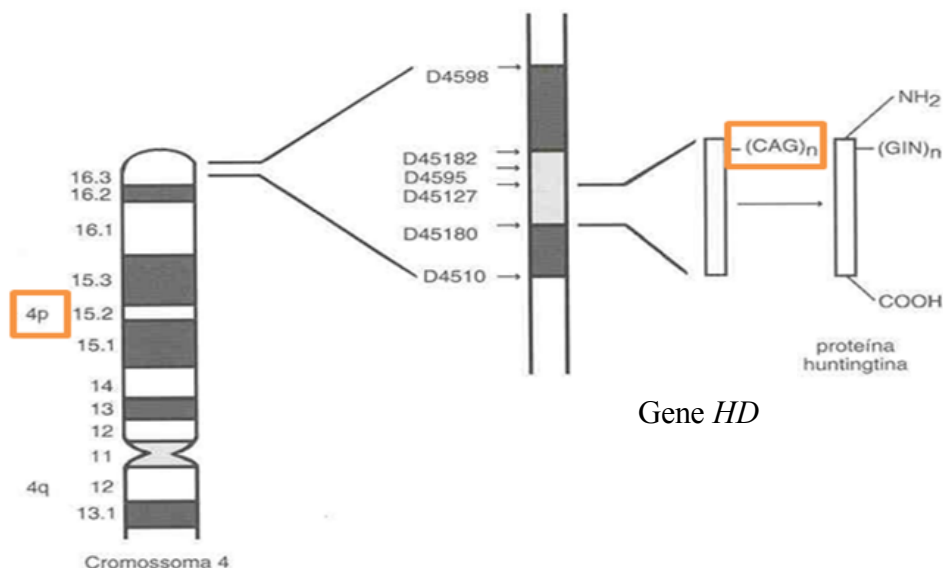
A nível do estriado, os neurónios espinhosos médios (que correspondem a 95% do número total de neurónios estriatais) são os mais afetados na DH. Estes neurónios utilizam o ácido gama-aminobutírico (GABA) como neurotransmissor inibitório, para além da dinorfina (péptido opióide endógeno) e encefalina (neuropéptido) [5, 9, 12], estando a sua perda associada aos movimentos involuntários verificados na DH [5, 10, 13]. A maioria dos neurónios GABAérgicos apresenta uma expressão elevada do recetor do tipo *N*-metil-



D-aspartato (NMDA) [12], o que potencia o aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , levando à disfunção mitocondrial e à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês “reactive oxygen species”) [2, 14]. A patologia de Huntington é também caracterizada pela presença de inclusões neuronais intracelulares [15, 16] e por agregados proteicos nos neurónios estriatais e corticais [16]. Foi ainda demonstrado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear que indivíduos com DH possuem níveis elevados de lactato no estriado e no córtex cerebral [17].

### 1.1.2 Genética da DH

A mutação génica causadora da DH foi descoberta, em 1993, por um grupo de investigadores da “Hereditary Disease Foundation” [18]. Estes investigadores identificaram uma expansão instável do triplete CAG (citosina-adenina-guanina), na região codificante 5' do exão 1 do gene *IT15* (do inglês “Interesting Transcript 15”) ou *HD* (do inglês “Huntington’s disease”), que codifica a proteína huntingtina (Htt) e se localiza no braço curto do cromossoma 4 [2, 3, 19]. A repetição instável de CAG codifica um longo domínio de glutaminas localizadas no terminal amínico ( $\text{NH}_2$ -) da Htt (Figura 2) [19, 20].



**Figura 2 – Localização do gene *HD* no braço curto do cromossoma 4.** A doença de Huntington é caracterizada pela repetição instável de CAG na proteína huntingtina que se localiza na região codificante 5' do exão 1 do gene *HD* no braço curto do cromossoma 4. Esta repetição instável codifica um longo domínio de glutaminas localizadas no terminal amínico da proteína huntingtina.  
 (Adaptado de Bates *et al.*, 2005 [21])

Uma vez que se trata de uma doença autossómica dominante, o alelo transmite-se de geração em geração segundo as regras de hereditariedade mendeliana. Indivíduos que herdaram a mutação patológica da DH desenvolvem os sintomas da doença, aproximadamente na meia-idade, e cada um dos seus filhos tem um risco de 50% de herdar a mutação. O alelo mutante torna-se instável durante a meiose, notando-se uma alteração no seu comprimento nas transmissões entre gerações, com um aumento de 1 a 4 unidades ou decréscimo de 1 a 2 unidades do triplete CAG. Em alguns casos são visíveis expansões maiores de CAG e que estão associadas à transmissão paterna, que tem sido associada a uma maior taxa de mutação durante a espermatogénese [1, 8].

Em indivíduos patologicamente afetados com DH, são identificadas cerca de 40 a 120 repetições CAG no gene *HD*, enquanto em indivíduos não afetados pela DH são identificadas 6 a 35 repetições [3]. Como referido anteriormente, o número de repetições CAG afeta a progressão da doença, sendo que este é o principal fator a determinar na idade em que se manifestam os primeiros sintomas. Desta forma, conclui-se que existe uma relação inversa entre o número de CAGs e a idade de início dos primeiros sintomas da doença [1]. No entanto, outros fatores poderão determinar o aparecimento dos primeiros sintomas, nomeadamente em indivíduos com repetição de CAG entre 40-45, uma vez que estes apresentam grande variabilidade na idade de início da DH.

### **1.1.3 Proteína huntingtina (Htt)**

A Htt *wild-type* é expressa na maioria das células do organismo e em diferentes áreas cerebrais, em particular no hipocampo, córtex, cerebelo e estriado [5]. É uma proteína de aproximadamente 348 kDa [1]. Vários estudos revelam que esta proteína, localizada no citoplasma das células neuronais, é capaz de aumentar a sobrevivência dos neurónios do estriado devido à regulação da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês “brain derived neurotrophic factor”). A Htt *wild-type* regula ainda a expressão génica e endocitose, dirige o tráfico vesicular em axónios e dendrites [22] e desempenha um papel importante na sinalização pós-sináptica.

A Htt mutante também é um dos fatores desencadeadores da lesão celular, pois interage de forma anormal com várias proteínas, desregulando importantes vias intracelulares, levando à degeneração de vias neuronais importantes e à perda celular no estriado, no córtex cerebral e noutras regiões cerebrais [7]. Apesar de não resultarem de um

efeito direto da Htt mutante, os mecanismos de excitotoxicidade, toxicidade dopaminérgica, desregulação metabólica, apoptose e autofagia têm sido implicados na patologia da DH [12, 23-25]. Por exemplo, a proteína interfere com a calmodulina no estriado e no córtex [26]. Estas interações induzem a disfunção proteica e a citotoxicidade verificadas na DH [7]. Além disso, vários estudos realizados em doentes com DH mostraram que a Htt mutante é hidrolisada por várias proteases intracelulares (incluindo as caspases) [26], levando à deposição de fragmentos (agregados) desta proteína no núcleo. Os agregados de Htt mutante podem interferir com a função normal das células, embora existam resultados contraditórios em relação à sua neurotoxicidade [7, 26].

#### **1.1.4 Modelos animais que expressam a proteína Htt mutante**

Com a descoberta da mutação, tornou-se possível criar modelos animais com um *background* genético semelhante ao estudado em humanos portadores da DH. Os modelos animais estudados podem ser estudados sob a forma de culturas primárias ou linhas celulares [27]. Ainda podem ser divididos em três modelos genéticos diferentes: murganhos *knock-out*, *knock-in* ou transgénicos [28, 29]. Os modelos DH *knock-out* foram os primeiros modelos a serem utilizados. No entanto não foram considerados bons modelos para caracterizar a doença porque embriões de ratinhos homozigóticos *knock-out* desta proteína morriam, demonstrando que a Htt desempenha um papel crucial na embriogénese [30]. Nos modelos DH *knock-in* a mutação é inserida no gene *Hdh* do murganho (que codifica a Htt do murganho), sendo homozigóticos ou heterozigóticos para a mutação. Na literatura, este tipo de modelo animal parece ser o mais viável para caracterizar a patologia em humanos. Em estudos comportamentais, um murganho *knock-in* com 72-80 repetições CAG mostraram ter um comportamento agressivo, embora sem perda neuronal aparente [28, 31]. Já os murganhos *STHdhQ<sub>111</sub>* têm 111 repetições CAG inseridas no gene DH murino e desenvolvem um fenótipo neurológico da DH de forma progressiva com especificidade para degeneração de neurónios do estriado. No entanto parecem não desenvolver fenótipo comportamental. Os murganhos *knock-in* com 150 repetições CAG apresentam anormalidades na locomoção e desenvolvem inclusões intracelulares neuronais no estriado. Por último os murganhos com 94 repetições CAG possuem microagregados nucleares. Por outro lado, os modelos transgénicos são aqueles em que o gene da proteína mutante, ou um fragmento do mesmo é inserido de forma aleatória no genoma do

murganho. Assim, o animal irá expressar um comprimento total ou o fragmento do gene mutante para além das duas cópias normais da huntingtina endógena do murganho (*Hdh*). Os murganhos R6/1 e R6/2 transgênicos foram os primeiros modelos de ratos transgênicos a estudar a DH [27]. Ambos expressam o exão 1 do gene humano que codifica o gene *HD* com cerca de 115 e 150 repetições CAG, respetivamente. Outro modelo animal transgênico são os murganhos N171-82Q que expressam um cDNA que codifica um fragmento *N*-terminal de Htt com 82 repetições de glutamina. Os murganhos transgênicos que expressam a Htt mutante *full-length* contendo 128 repetições CAG (YAC128, do inglês “yeast artificial chromosome transgenic mice”) apresentam um tempo de vida mais longo comparativamente aos R6/2 e aos N171-82Q e, desta forma, são mais utilizados para estudos que impliquem maior tempo de investigação [32]. Uma outra característica é que a perda de células que apresentam é limitada ao estriado, informando de certa forma a seletividade da região que leva ao início da DH.

As linhas celulares derivadas do estriado de murganhos transgênicos DH *knock-in wild type* ou mutantes homozigóticos provenientes de células do estriado expressam a Htt normal endógena (Q<sub>7</sub>) ou Htt mutante com 111 glutaminas (Q<sub>111</sub>), respetivamente [28]. As células representam fases iniciais da patologia da DH. Ainda, alguns estudos mostraram que a respiração mitocondrial e a produção de ATP estão significativamente reduzidas em células STHdhQ<sub>111</sub> comparativamente às células *wild type* [28]. Por outro lado podem ser utilizadas em estudos que necessitam de um longo período de experimentação, uma vez que são células aderentes que estão em cultura e facilmente são expandidas e disponíveis. Por fim, os híbridos são linha celulares eucarióticas formadas pela fusão de células enucleadas com células desprovidas de DNA mitocondrial e são utilizadas para estudar as consequências bioquímicas de mutações mitocondriais conhecidas na doença [28].

### **1.1.5 Tratamento da DH**

Até ao momento, não existe um tratamento específico para a DH, embora alguns fármacos possam ser administrados com o objetivo de atenuar os sintomas que a doença acarreta. A partir do momento em que Thomas Perry [33] descreveu a relação entre a DH e a deficiência nos neurónios GABAérgicos, foram testados vários fármacos clinicamente disponíveis para tentar diminuir os efeitos coreicos nos doentes de DH [10, 12]. Nos anos 70 verificou-se que os fármacos antipsicóticos e os fármacos com efeitos no sistema

dopaminérgico possuíam não só efeitos na diminuição dos movimentos coreicos, mas também nas desordens psiquiátricas associadas à DH [10]. Evidentemente, estas drogas são apenas atenuantes dos efeitos que a DH provoca. Por outro lado, até ao momento foram feitos vários estudos no sentido de desenvolver formas de terapia anti-degenerativas. Nesse âmbito foram testados vários compostos que intervêm nos processos de disfunção mitocondrial, apoptose e em processos metabólicos. Por exemplo, a coenzima Q10 (CoQ10), um cofator essencial no sistema de transporte de eletrões, foi testada clinicamente e apresenta efeitos benéficos na disfunção mitocondrial provocada pela DH [3, 17]. Por outro lado, a creatina, um substrato da creatina cinase, tem um efeito protetor nos neurónios contra as alterações metabólicas e formação das ROS [34]. De entre os processos de neurodegeneração que podem ser alvo de ação terapêutica na DH destacam-se os processos apoptóticos e o stresse oxidativo, ambos descritos nas secções seguintes.

## **1.2 Apoptose**

O termo “apoptose” surgiu pela primeira vez em 1972 por Kerr, Wyllie e Currie, para designar o tipo de morte celular que ocorre de forma accidental [35]. Já em 1964, tinha surgido o termo “morte celular programada” para identificar este tipo de morte celular [36, 37]. A apoptose ocorre naturalmente durante o desenvolvimento e o envelhecimento como forma de manter a homeostasia nas populações celulares [35], funcionando também como um mecanismo de defesa que permite a eliminação de células danificadas ou infetadas. No entanto, defeitos na regulação da apoptose podem desencadear o desenvolvimento de uma variedade de doenças, tais como cancro, auto-imunidade e doenças neurodegenerativas [38-40].

A apoptose pode ser reconhecida por características muito marcantes e coordenadas, uma vez que ocorre numa sequência de eventos morfológicos bem definidos [41], entre os quais a condensação da cromatina, clivagem proteica e quebra da estrutura de DNA [42], a contração do citoplasma e alterações da membrana plasmática [43]. Neste processo ocorre a formação de corpos apoptóticos (pequenas vesículas que contêm citoplasma e organelos) que são subsequentemente fagocitados, não se desencadeando uma resposta inflamatória [37, 44]. O mecanismo apoptótico pode ocorrer em diversas situações, como por exemplo na organogénese e na hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta

inflamatória e ainda na eliminação de células após lesão celular por agentes genotóxicos [45]. Existem diversos fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles a ligação de moléculas a recetores membranares, radiação ionizante, lesões no DNA, privação de fatores de crescimento e níveis elevados de ROS [36].

Existem quatro grupos principais de proteínas envolvidas na apoptose: as caspases, as proteínas adaptadoras (que controlam a ativação das caspases efetoras), os membros da superfamília dos recetores do TNF (do inglês “Tumor Necrosis Factor”) e membros da família de proteínas Bcl-2 [44].

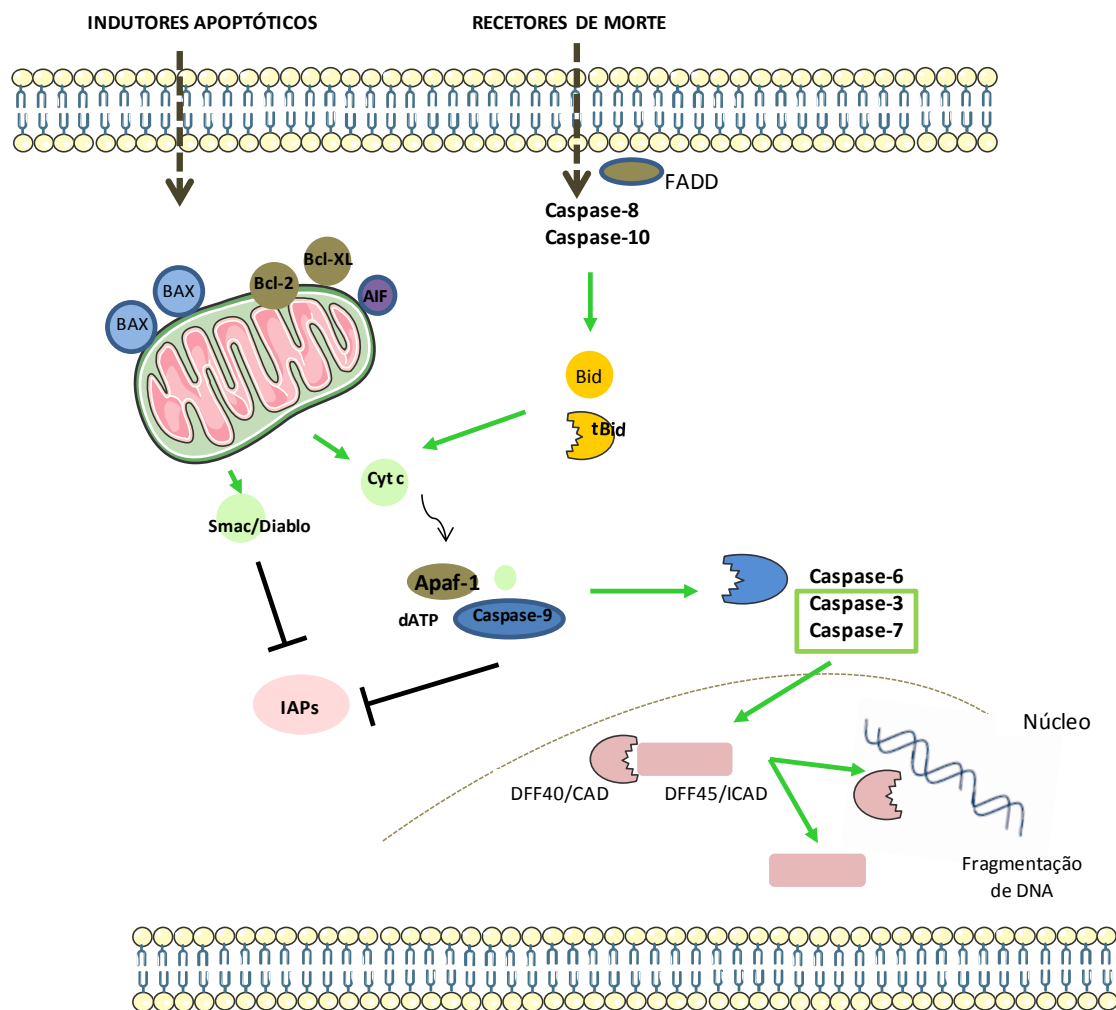
### **1.2.1 Vias de ativação da apoptose**

No geral, considera-se que a apoptose pode ocorrer por duas vias: a via dos recetores de morte (extrínseca) e a via mitocondrial (intrínseca) [36], ambas representadas na Figura 3.

A via dos recetores de morte é desencadeada após a ligação de ligandos específicos a um grupo de recetores de membrana tais como os da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) [46]. Ao domínio citoplasmático dos recetores de morte dá-se o nome de “domínio de morte” e por isso os recetores são designados por “recetores de morte celular” [47]. Quando estes recetores reconhecem um ligando específico, os seus domínios de morte interagem com as moléculas FADD (do inglês “Fas-associated via death domain”) [48], que têm a capacidade de recrutar pró-caspases, em particular a pró-caspase-8 e -10. Este processo resulta na ativação das caspases iniciadoras, e na subsequente ativação de “caspases efetoras”, tais como as caspases -3, -6 e -7 induzindo desta forma a ativação de uma cascata de caspases [49].

Na via mitocondrial, os sinais são traduzidos em resposta ao stresse intracelular e convergem principalmente na mitocôndria [36]. De especial importância nesta via são as proteínas da família Bcl-2 (do inglês, “B-cell lymphoma 2”), responsáveis pela sua regulação. O passo-chave da via mitocondrial é a permeabilização da membrana externa das mitocôndrias através da formação de canais. Nestes inclui-se a formação de poros de permeabilidade transitória mitocondrial – MPTP (do inglês “mitochondrial permeability transition pore”) ou a oligomerização de proteínas pró-apoptóticas. Estes canais conduzem à libertação de proteínas mitocondriais para o citosol, nomeadamente o citocromo c [50]. Uma vez no citosol, o citocromo c funciona como um cofator para a formação dependente

de ATP de um complexo proteico constituído pelas proteínas Apaf-1 (do inglês, “Apoptotic protease-activating factor-1”) [42], pró-caspase-9 e dATP (desoxi-ATP), o apoptossoma. A formação do apoptossoma conduz à ativação da caspase-9 [41] e à consequente ativação das caspases efetoras -3 e -7, o que provoca uma rápida amplificação do sinal de morte através da ativação de outras proteínas [51, 52]. Entre as proteínas mitocondriais libertadas para o citoplasma encontra-se também a SMAC/DIABLO (do inglês “Second mitochondrial-derived activator of caspases/Direct IAP-binding protein with low pI”), que se liga às IAPs (do inglês “Inhibitor of apoptosis proteins”), antagonizando o seu efeito anti-apoptótico [53, 54]. Mais recentemente foi descoberta a participação na via mitocondrial, de uma proteína conhecida por fator indutor da apoptose (AIF, do inglês “apoptosis inducing factor”). Esta proteína migra da mitocôndria para o núcleo após um estímulo de apoptose e induz a condensação da cromatina e fragmentação do DNA, independentemente da ativação das caspases. O processo apoptótico termina com a condensação da cromatina e fragmentação do DNA. A condensação e fragmentação da cromatina são mediadas pela ativação do DFF (do inglês, “DNA fragmentation factor”), um complexo proteico heterodimérico composto pelas subunidades DFF40/CAD (do inglês “caspase-activated DNase” e DFF45/ICAD (do inglês “inhibitor of CAD- caspase-activated DNase”). Quando a segunda subunidade é clivada pelas caspases-3 e -7, dissocia-se da subunidade DFF40/CAD e esta torna-se ativa [55]. Consequentemente, a DFF40/CAD oligomeriza formando um complexo que cliva o DNA [56].



**Figura 3 – Esquema representativo das duas vias apoptóticas.** A via extrínseca (representada à direita) é desencadeada por ativação dos recetores de morte. Quando estes recetores reconhecem um ligando, interagem com as moléculas FADD, desencadeando a ativação das caspases iniciadoras: caspases-8 e -10. Estas por sua vez vão clivar e ativar as caspases efetoras: caspases-3, -6, e -7. Na via intrínseca (representada à esquerda) dá-se a permeabilização da membrana mitocondrial, ocorrendo a libertação do citocromo c. Este libertado no citosol liga-se à Apaf-1 e, na presença de dATP, ativa a caspase-9. Esta caspase é responsável pela clivagem e ativação da caspase-3. As caspases-3 e -7 ativam o complexo DFF, composto por duas subunidades, DFF40/CAD e DFF45/ICAD. A subunidade DFF49/CAD tem atividade de nucleasse e é responsável pela fragmentação do DNA e condensação da cromatina.  
 (Adaptado de Vries *et al.*, 2006 [57])

## 1.2.2 Caspases

Uma vez que as caspases são proteases chave envolvidas nas duas vias de morte por apoptose torna-se importante rever alguns conceitos sobre estas proteínas. As caspases (do inglês “cysteine-aspartic proteases”) são enzimas proteolíticas de cisteína [42] (possuem



uma cisteína no local ativo) e têm a capacidade de reconhecer e hidrolisar substratos que possuam resíduos de aspartato [58]. Sabe-se que os mamíferos possuem pelo menos catorze genes para as caspases, dos quais seis (caspases-3, -6, -7, -8, -9, -10) participam na apoptose [42, 59]. Estruturalmente, as caspases são heterotetrameros, com duas subunidades grandes e duas pequenas associadas numa molécula compacta [42]. Estas proteases são sintetizadas na forma de um precursor inativo [36], que é constituído por um pró-domínio *N*-terminal seguido por domínios que codificam as subunidades grandes e pequenas [58]. As caspases existem normalmente na célula numa forma inativa [41]. Após clivagem proteolítica, ficam ativadas e clivam uma série de proteínas, incluindo certos substratos-chave cuja alteração da função leva à morte da célula por apoptose [46, 60]. De acordo com o seu pró-domínio e o seu papel na apoptose, as caspases são classificadas em dois grupos: as caspases iniciadoras (caspases -2, -8, -9 e -10) e as caspases efetoras (caspases -3, -6 e -7) [42, 61, 62]. As caspases iniciadoras possuem pró-domínios longos e estão envolvidas na iniciação da cascata proteolítica [42]. Por outro lado, as caspases efetoras possuem pró-domínios curtos ou inexistentes e são responsáveis pela hidrólise dos substratos [58, 63].

Em geral, a ativação das caspases iniciadoras deve-se às proteínas adaptadoras (recetores de morte e molécula intracelular Apaf-1) que possuem motivos de interação seletivos [58]. Este processo permite a auto hidrólise das pró-caspases e a libertação das caspases iniciadoras ativas, que desencadeiam a cascata apoptótica através da hidrólise e consequente ativação das caspases efetoras [42].

As caspases podem adotar inúmeras funções. Por exemplo, hidrolisam várias proteínas que normalmente atuam na deteção e reparação de danos no DNA. Atuam também nas mitocôndrias, hidrolisando, por exemplo, a Bid (membro pró-apoptótico da família Bcl-2). De notar que quando clivado, a Bid promove a libertação do citocromo c, promovendo a cascata apoptótica através da ativação das caspases -9 e -3 [40, 61, 64].

### **1.2.3 Proteínas da família Bcl-2**

A libertação do citocromo c e de outros fatores apoptóticos das mitocôndrias para o citoplasma é um processo que tem que ser altamente regulado, sendo essa função desempenhada pelas proteínas da família Bcl-2 [50, 65, 66]. Esta família é composta por proteínas pró- e anti-apoptóticas, classificadas em três grupos consoante a sua função e os

domínios de homologia com a Bcl-2 (domínios BH) que possuem. Existem quatro regiões de homologia, designadas por BH1, BH2, BH3 e BH4 [67]. O grupo I é composto por proteínas anti-apoptóticas, (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, Mcl e A1) que possuem os quatro domínios BH e, na sua maioria, uma cauda hidrofóbica no seu C-terminal que lhes permite ancorar à superfície de várias membranas intracelulares, como, por exemplo, o núcleo, a membrana do retículo endoplasmático ou a membrana externa da mitocôndria. Estas proteínas previnem a morte celular, ligando-se e resgatando proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 dos grupos II e III. O grupo II é composto por proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak e Bok), cuja estrutura difere das do grupo I por omissão do domínio BH4. A Bax e a Bak estão diretamente envolvidas na libertação do citocromo c das mitocôndrias. Finalmente, o grupo III é composto por proteínas pró-apoptóticas que contêm apenas o domínio BH3 (Bid, Bad, Bik, Bim, Blk, Bmf, Bnip3, Noxa e Puma), designadas por “BH3-only proteins” [50]. Estas proteínas respondem a uma série de estímulos pró-apoptóticos e atuam ligando-se às proteínas do grupo I e II através dos seus domínios BH3 [52].

#### **1.2.4 Apoptose & doença de Huntington**

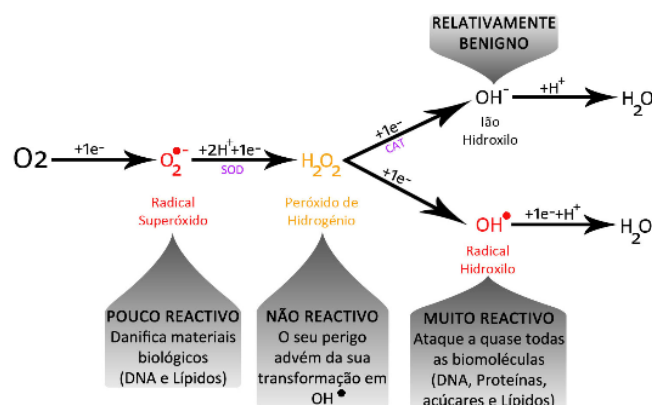
Embora a hipótese de ocorrência de um processo apoptótico na morte celular em DH seja ainda controversa, existem evidências que a ativação de determinadas vias apoptóticas pode contribuir para o desenvolvimento desta patologia [35, 36]. Como descrito anteriormente, a progressão da DH deve-se, em grande parte, à disfunção intracelular induzida pela proteína Htt mutante, que provoca a degeneração de vias neuronais importantes e a perda de células, principalmente, no estriado e no córtex. Assim, a Htt mutante é considerada um substrato de enzimas proteolíticas, nomeadamente de caspases e calpaínas (proteases de cisteína dependentes de cálcio) [68]. De facto vários estudos revelaram que a atividade das calpaínas, da caspase-1 [69] e da caspase-8 [70] se encontra aumentada em cérebros de doentes de Huntington. Vários estudos mostraram ainda que os fragmentos de Htt mutante podem induzir, direta ou indiretamente, a abertura do MPTP. Como referido na secção 1.2.1, a abertura de poros na membrana mitocondrial interna provoca a libertação do citocromo c [24], e a consequente ativação das caspases. Ainda, quando ativadas, as caspases efetoras podem hidrolisar a Htt mutante e desta forma promover a sua translocação para o núcleo. Warby *et al.*, (2008) [71] verificaram que o núcleo é o local privilegiado para a hidrólise da Htt pela caspase-6, enquanto a hidrólise da

Htt pelas caspases-2 e -3 geram fragmentos que se acumulam, maioritariamente, na região perinuclear [71, 72].

### **1.3 Stresse oxidativo**

Durante o funcionamento normal das células dos organismos aeróbios produzem-se radicais livres sob a forma de ROS e de espécies reativas de nitrogénio (RNS). A exposição destes organismos a radicais livres conduziu ao desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidantes. A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes (de que são exemplo a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase, ou a catalase) é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo. Quando este equilíbrio tende para a produção de radicais livres, diz-se por definição, que o organismo está em stresse oxidativo. Neste caso, os radicais livres em excesso podem oxidar e danificar os lípidos, proteínas e DNA, alterando a sua função normal. Este processo está envolvido em várias doenças [35, 73] como o cancro, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares e desordens neurológicas [74].

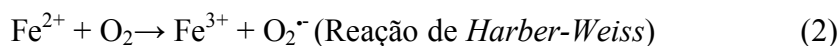
Os radicais livres são espécies químicas com um ou mais eletrões desemparelhados, [35] ou seja, têm orbitais com apenas um eletrão, apresentando uma forte reatividade com a maioria das espécies químicas. De entre as ROS destacam-se o radical superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), o radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), o radical alcóxido ( $RO^{\bullet}$ ), o radical peróxido ( $ROO^{\bullet}$ ) e o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) [75, 76]. Apesar de reativas, as ROS possuem um tempo de semivida biológica curto e por isso, uma ação de carácter transitório a nível celular. A Figura 4 apresenta algumas das reações de formação de ROS.



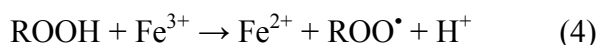
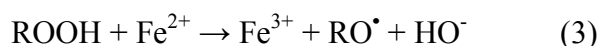
**Figura 4 – Formação de espécies reativas de oxigénio e radicais livres, e a sua severidade quando atacam um organismo vivo.** O radical superóxido é considerado pouco reativo (danifica materiais biológicos), o peróxido de hidrogénio é não reativo (e o seu perigo advém da sua transformação em OH<sup>•</sup>). O radical hidroxilo é muito reativo (ataca quase todas as biomoléculas) e ião hidroxilo é benigno. (Adaptado de Meister *et al.*, (1983) [77]).

Pelo simples facto do metabolismo humano consumir oxigénio, as ROS são continuamente produzidas em vários locais da célula, como no retículo endoplasmático, lipossomas, peroxissomas, citosol e principalmente na mitocôndria [35, 73, 78]. Mais especificamente, estas espécies são normalmente produzidas por enzimas altamente reguladas.

O oxigénio molecular, essencial em organismos aeróbios, no estado fundamental é denominado por bi-radical, e contém dois eletrões desemparelhados [79]. No entanto, a adição de um eletrão ao oxigénio molecular (redução incompleta do oxigénio) forma o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> que é normalmente considerado o agente ROS “primário”, principalmente produzido nas mitocôndrias [35, 73]. A formação deste radical ocorre devido à “fuga” de eletrões dos complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial [35]. Apesar do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> não ser muito reativo, pode desencadear uma série de reações químicas com os ácidos gordos poli-insaturados dos fosfolípidos, comprometendo assim a organização celular. O O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pode sofrer dismutação, formando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 O<sub>2</sub><sup>•-</sup> + 2 H<sup>+</sup> → H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + O<sub>2</sub>) [76]. Ao contrário do superóxido, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode atravessar as membranas biológicas e, apesar de não ser muito reativo, é um intermediário da síntese do radical hidroxilo (HO<sup>•</sup>). Este radical forma-se a partir da oxidação de iões metálicos como o Fe<sup>2+</sup> e o Cu<sup>+</sup> [80], pelas reações de *Fenton* (reação 1) e *Harber-Weiss* (reação 2).



O radical  $\text{HO}^\bullet$  tem um tempo de vida muito curto, mas é muito reativo, sendo considerado o radical que provoca um maior número de danos celulares. Este radical pode atacar e danificar todas as biomoléculas, incluindo glícidos, lípidos, proteínas e DNA [74, 81]. Destaca-se a peroxidação lipídica, que resulta na acumulação de hidroperóxidos ( $\text{ROOH}$ ), que são degradados na presença de iões ferro-II (reação 3) e ferro-III (reação 4) ou cobre-I.



Os radicais alcóxido ( $\text{RO}^\bullet$ ) e peróxido ( $\text{ROO}^\bullet$ ), formados pela degradação dos hidroperóxidos, podem danificar as proteínas da membrana e atacar novas moléculas lipídicas de modo a propagar a peroxidação lipídica.

### **1.3.1 Stresse oxidativo & doença de Huntington**

Como referido anteriormente (1.1.1), a produção excessiva de ROS contribui para a neurodegenerescência progressiva no estriado dos doentes de Huntington [5, 75]. A disfunção mitocondrial causada pela ativação do recetor do glutamato do tipo NMDA nos neurónios GABAérgicos leva à produção de ROS [5, 75, 82]. Estudos realizados em doentes de Huntington permitiram observar alterações metabólicas e mitocondriais, nomeadamente uma diminuição significativa da captação de glicose no córtex e no estriado de indivíduos portadores da mutação para DH [5] e uma diminuição significativa da atividade da aconitase [75], um indicador indireto da formação de ROS a nível mitocondrial [42]. Foi também observado um decréscimo das atividades dos complexos mitocondriais II, III [3] e IV no estriado [73, 83], um aumento da concentração de lactato no estriado e no córtex cerebral [17] e um decréscimo da formação de ATP mitocondrial [84, 85]. Alguns estudos revelaram ainda alterações morfológicas e um decréscimo do potencial mitocondrial em linfoblastos derivados de doentes de Huntington [86, 87] e uma

diminuição do número de cópias do DNA mitocondrial (mtDNA) em leucócitos de doentes de Huntington [88].

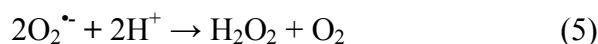
### 1.3.2 Antioxidantes

A exposição dos organismos aeróbios a radicais livres conduziu ao desenvolvimento de mecanismos de defesa, de prevenção e de reparação de forma a conseguir eliminar eficientemente essas espécies. Segundo vários autores, os antioxidantes são substâncias endógenas ou exógenas capazes de bloquear o processo de oxidação, neutralizando os radicais livres [89, 90]. Mais especificamente, os antioxidantes agem nos organismos vivos por meio de diferentes mecanismos. Estes podem envolver: a captura de radicais livres, a decomposição de peróxidos, a complexação de iões metálicos envolvidos nas reações de *Fenton* e *Harber-Weiss*, a inibição de enzimas responsáveis pela geração de ROS e RNS e a modulação de vias sinalizadoras celulares [90].

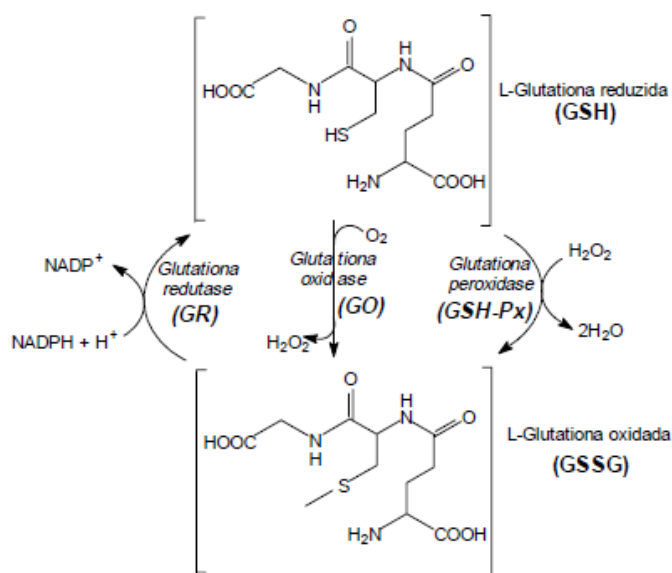
Uma primeira linha de defesa contra as ROS é, naturalmente, a proteção contra a sua formação, ou seja a sua prevenção. Existem inúmeras estratégias biológicas destinadas a evitar o stresse oxidativo, como por exemplo, a prevenção das reações em cadeia, um mecanismo importante na prevenção da peroxidação lipídica e da fragmentação do DNA [91]. Um outro mecanismo antioxidante é a “desativação” da espécie oxidante. Este mecanismo ocorre quando um radical livre sofre um processo de redução por ação do composto antioxidante. Contudo, este mecanismo está bastante dependente do poder antioxidante da substância neutralizante das ROS [90, 91]. No entanto, e no caso em que os mecanismos de proteção e interceção não sejam completamente eficientes, existem várias enzimas proteolíticas envolvidas na reparação e reconstituição de DNA. Estas defesas podem ser enzimáticas ou não enzimáticas, conforme a estrutura do agente antioxidante [74].

As defesas antioxidantes enzimáticas encontram-se em grande número por todo o organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular [2, 42]. A superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione reductase (GR) são alguns exemplos deste tipo de defesas antioxidantes. A superóxido dismutase converte o  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  (reação 5), que por sua vez, é transformado em  $H_2O$  pela catalase nos peroxissomas, ou pela glutathione peroxidase nas mitocôndrias e no citoplasma (reação 6) [81]. De notar que existem diferentes formas da SOD nos animais: a CuZnSOD ou

SOD1 (citossólica), a SOD extracelular (EC-SOD) e a MnSOD ou SOD2 (mitocondrial). Vários estudos revelaram que a SOD, em particular a CuZnSOD, apresenta uma expressão relativamente elevada em neurónios da substância negra e neurónios motores [92, 93].



A GPx localiza-se no citoplasma e na matriz mitocondrial e tal como a catalase reduz o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  utilizando glutathiona na sua forma reduzida (GR), convertendo-a em glutathiona oxidada (GSSH) (Figura 5) [94]. Esta enzima possui uma característica importante, apresentando um resíduo de cisteína com selénio covalentemente ligado à enzima. Contudo, a sua ausência leva à diminuição da atividade da GPx na forma reduzida, provocando por sua vez, alterações no metabolismo celular. Outra enzima que age conjuntamente com a GPx é a GR, que embora não remova diretamente as ROS é responsável pela regeneração da glutathiona na sua forma reduzida (GSH), na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) [74].



**Figura 5 – Esquema representativo da conversão da glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona oxidase (GO) e glutathiona redutase (GR).**

(Adaptado de Meister *et al.*, 1983 [77])

Os antioxidantes não enzimáticos podem ser classificados em antioxidantes hidrofílicos, como por exemplo, a GSH, o ácido ascórbico (ou vitamina C), ou em antioxidantes lipofílicos, como o  $\alpha$ -tocoferol (ou vitamina E), os carotenóides e os flavonoides [74]. A GSH é um tripeptídeo de baixo peso molecular e tem na sua composição glutamato, cisteína e glicina [42]. É um agente sequestrador de radicais livres, reagindo diretamente com estes, ou indiretamente como co-fator de enzimas antioxidantes. O ácido ascórbico está presente em elevadas concentrações no sistema nervoso central e tem como funções a regeneração do  $\alpha$ -tocoferol, além de desempenhar um importante papel importante na captação das ROS [80]. O  $\alpha$ -tocoferol é um antioxidante lipofílico, que se encontra associado às membranas biológicas, inibindo a peroxidação lipídica [42]. Os carotenóides são antioxidantes que funcionam como captadores de ROS. De notar que deste grupo de compostos, o  $\beta$ -caroteno é o mais abundante e o que apresenta maior atividade antioxidante. Os flavonoides são antioxidantes igualmente importantes na defesa contra os radicais livres a nível celular. Estes inibem enzimas responsáveis pela produção do anião superóxido, como a proteína cinase C [95]. Por outro lado, estes compostos podem também inibir as ciclogenases, lipogenases, glutathione-S-transferase e a NADPH oxidase, enzimas envolvidas na produção de ROS. Alguns flavonoides funcionam, ainda, como quelantes de metais que desempenham um papel importante no metabolismo do oxigénio. Devido ao seu baixo potencial redox, os flavonoides são termodinamicamente capazes de reduzir radicais livres altamente oxidantes (por exemplo,  $O_2^{\bullet-}$ ,  $HO^{\bullet}$ ,  $RO^{\bullet}$ ,  $ROO^{\bullet}$ ) através da doação de um átomo de hidrogénio [96], como representado na reação 7. De notar que nesta reação o Fl-OH representa os flavonoides e o  $R^{\bullet}$  representa o  $O_2^{\bullet-}$ , ou  $HO^{\bullet}$ ,  $ROO^{\bullet}$  e/ou  $RO^{\bullet}$ .



Uma vez que este trabalho envolve a avaliação dos efeitos protetores mediados por compostos flavonoides, a estrutura e algumas das suas atividades biológicas serão revistos na próxima secção.

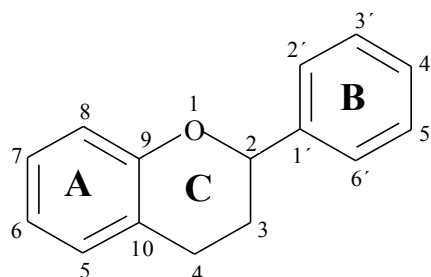


## 1.4 Flavonoides

### 1.4.1 Estrutura química dos flavonoides

Os flavonoides, do latim “flavus” que quer dizer “amarelo” é um termo genérico com que se identifica uma série de metabolitos secundários das plantas [97]. São um grupo de moléculas de baixo peso molecular, amplamente distribuídos no reino vegetal, e representam uma parte significativa da dieta ocidental, uma vez que são constituintes da fruta, legumes e bebidas [98].

Estes compostos fazem parte de um grupo particular de metabolitos secundários, denominado por compostos fenólicos [99]. São caracterizados por uma estrutura geral com quinze átomos de carbono,  $C_6-C_3-C_6$ , na qual dois anéis benzénicos se encontram ligados por uma cadeia linear de três átomos de carbono, podendo ou não formar um terceiro anel heterocíclico [99-101]. Os anéis são designados por A, B e C, e o sistema de numeração tem início no átomo de oxigénio do anel heterocíclico, seguindo-se até aos carbonos envolvidos na junção dos anéis (Figura 6) [99, 100].

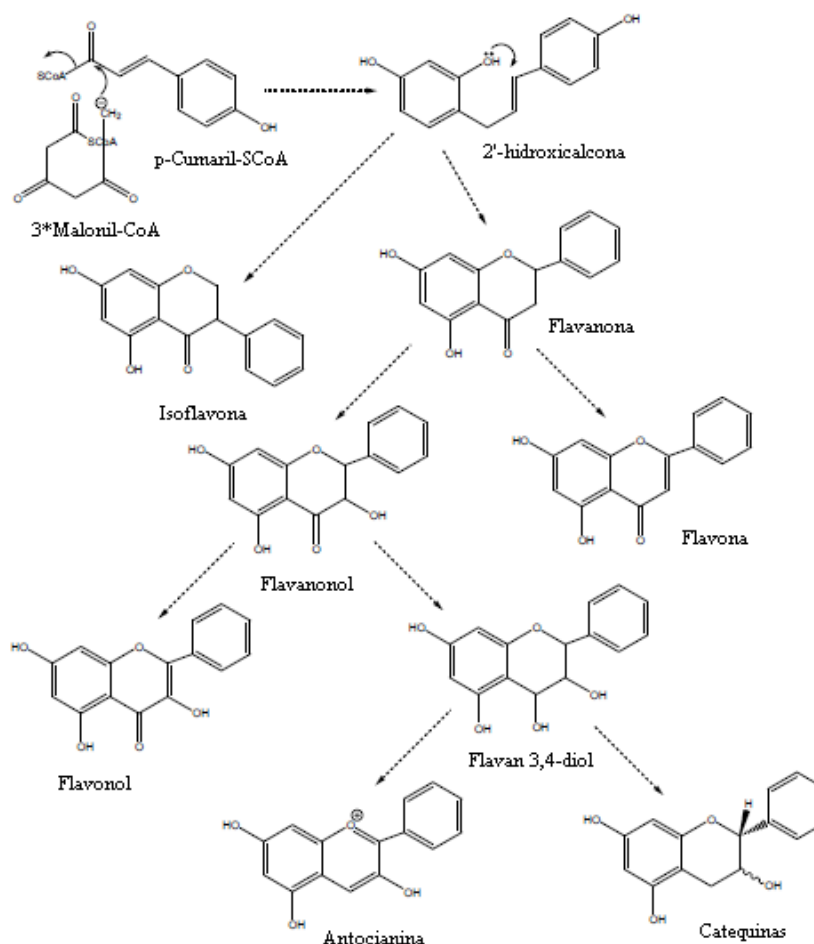


**Figura 6 – Estruturas básica de um flavonoide.**  
 Constituído por 15 átomos de carbonos,  $C_6-C_3-C_6$  na qual dois anéis benzénicos (A e B) se encontram ligados por uma cadeia linear de três carbonos, podendo formar um terceiro anel heterocíclico (C).  
 (Celik *et al.*, 2012 [95]).

A biossíntese destes compostos envolve uma molécula de fenilalanina e três moléculas de malonil-CoA [97]. Este processo tem início com a transformação da fenilalanina em ácido cinâmico pela fenilalanina amónio liase, que é uma enzima que liga os metabolitos primários (via do ácido xiquímico) e secundários (fenilpropanóides). O ácido cinâmico é hidrolisado a ácido cumárico (C9) que, por sua vez, é transformado em 4-

cumaroil-CoA. A condensação deste último com três moléculas de malonil-CoA (C2) origina uma 2'-hidroxicalcona (C15), a partir da qual todos os flavonoides são formados (Figura 7) [99].

De notar no entanto que os flavonoides possuem uma grande variedade de estruturas, por alterações e adições de grupos funcionais à estrutura acima mencionada (Figura 6). Em geral, os flavonoides podem classificar-se em classes distintas, flavonas, flavanonas, flavonóis, 2,3-di-hidroflavonóis, isoflavonas, calconas, antocianidinas e antocianinas, entre outros [97, 101], de acordo com as suas isomerizações e os seus grupos funcionais.



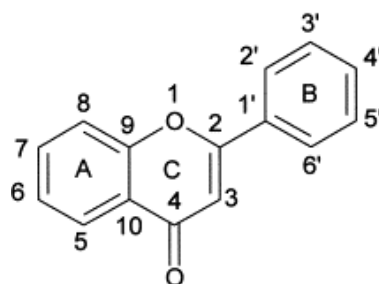
**Figura 7 – Biossíntese e estruturas químicas dos oito principais subgrupos de flavonoides.** A condensação do 4-cumaroil-CoA com três moléculas de malonil-CoA (C2) origina uma 2'-hidroxicalcona (C15), a partir da qual todos os flavonoides (isoflavona, flavanona, flavanonol, flavona, flavonol, flavan 3,4-diol, antocianina e catequina) são formados. (Lepiniec *et al.*, 2006 [102]).

Nos últimos anos, os flavonoides têm sido alvo de inúmeras investigações. Tal facto deve-se à associação destes compostos a efeitos benéficos na saúde humana. Na realidade, estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado uma ampla variedade de atividades biológicas dos flavonoides, entre as quais a sua capacidade antioxidante, que é sem dúvida a atividade mais elucidada pelos estudos até agora desenvolvidos [98, 103-105]. Segundo alguns investigadores, esta atividade dos flavonoides está associada: (a) à presença de um grupo carbonilo, (b) à dupla ligação C2=C3, (c) à presença de uma unidade catecol no anel B, (d) o grupo 4'-OH conjugado com o 3-OH, e (e) à presença de grupos hidroxilo nas posições 3- e 5- na estrutura molecular de uma flavona [98, 104]. Além disso, a eficiência antioxidante das hidroxiflavonas tem sido relacionada com o número de grupos hidroxilo na molécula, assim como a capacidade de doar átomos de hidrogénio. Os flavonoides possuem também atividade anti-inflamatória e de vasodilatação [105], atividade anti-hepatóxica, atividade antiviral, antimicrobiana, anti-neoplásica e ativação das plaquetas [98], entre outras. Particularizando, o efeito da quercetina foi analisado em células leucocitárias humanas e verificou-se que este flavonoide inibe a ação dos leucotrienos (lípidio da família dos eicosanóides, que atuam em processos de inflamação crónica, aumentando a permeabilidade vascular, surgindo o edema na zona inflamada) [106]. O flavonol, epicatequina mostrou proteger células neuronais contra danos oxidativos através do mecanismo que envolve a supressão do JNK (do inglês “*c-jun-N-terminal kinases*”) e pró-caspase-3 [107]. De entre os flavonoides, as flavonas e os flavonóis são duas classes muito comuns e associadas a muitas destas atividades biológicas [89, 97, 98].

Considerando que este trabalho é focado em derivados sintéticos da flavona luteolina, este grupo de flavonoides é descrito em seguida em maior detalhe.

#### **1.4.2 Flavonas**

São caracterizadas pela presença de uma ligação dupla entre C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> e apresentam substituintes nos anéis A e B (Figura 8). A sua classificação é feita de acordo com as várias características funcionais, tais como a hidroxilação, *O*-metilação, *C*-metilação, e/ou isoprenilação [108].



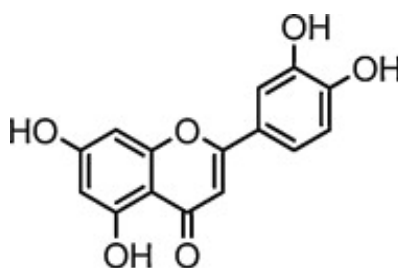
**Figura 8 – Estrutura química de uma flavona ( $C_{15}H_{10}O_2$ ).**

As flavonas são metabolitos secundários da classe dos flavonoides e possuem uma ligação dupla entre  $C_2$  e  $C_3$ . (Marder *et al.*, 2001 [109]).

Até ao momento, foram já descobertas mais de 300 flavonas que não possuem resíduos de açúcar e aproximadamente 500 flavonas glicosiladas [110]. Existe uma enorme variedade de plantas que produzem flavonas, podendo estas ser extraídas de folhas, sementes, raízes, flores, frutos, caule, e até de resinas [111]. Ainda, os grãos e ervas são particularmente ricos nestes compostos. Nas fontes acima mencionadas, encontram-se vulgarmente as flavonas apigenina (4',5,7-tri-hidroxiflavona), luteolina (3',4',5,7-tetra-hidroxiflavona) e a diosmetina (3',5,7-tri-hidroxi-4'-metoxiflavona) [112].

### 1.4.3 Luteolina-ação protetora

A luteolina (3',4',5,7-tetra-hidroxiflavona) (figura 9) é uma flavona [100] com capacidade antioxidante e anti-inflamatória, estando também descrita como modulador da função neuronal e como supressor de muitas moléculas apoptóticas [98, 103, 104, 113, 114].



**Figura 9 – Estrutura química da luteolina ( $C_{15}H_{10}O_6$ ).**

É um composto pertencente ao grupo das flavonas. (Duan *et al.*, 2011 [115]).

Em relação à sua capacidade anti-inflamatória, a luteolina suprime a produção de citocinas pró-apoptóticas nos macrófagos, bloqueando o fator de transcrição NF-kB. Esta flavona induz também a diminuição da libertação de TNF e do radical superóxido em células da microglia [114]. Um estudo feito em células da glia revelou que a luteolina aumenta a regulação de quatro enzimas antioxidantes importantes: Srxn-1 (do inglês “Sulfiredoxin 1”), Blvrb (do inglês “Biliverdin reductase B”), GCL (do inglês “Glutamate-cysteine ligase”) e HO-1 (do inglês “Heme oxygenase 1”) [114]. A Srxn-1 é uma proteína oxidoreductase encontrada principalmente no citoplasma e contribui para a resistência ao stresse oxidativo, reduzindo o ácido sulfínico da cisteína formado pela exposição a oxidantes [76]. A biliverdina redutase B (Blvrb) é responsável pela formação de bilirrubina a partir da biliverdina e está envolvida na regulação do metabolismo do ferro [116]. A glutamato cisteína ligase (GCL) é uma enzima envolvida na síntese de glutathione, e a heme oxigenase-1 (HO-1) é uma enzima essencial no catabolismo do heme [114]. Este estudo mostrou ainda que a luteolina reduz a produção de interleucina-6 (IL-6), maioritariamente por inibição da sinalização do JNK, (do inglês “c-Jun *N*-terminal kinase”) (proteína que ajuda a regular o processo de autodestruição celular) e por ativação da proteína 1 (AP1) [117, 118]. Dados da literatura indicam que os efeitos neuroprotetores da luteolina são também verificados na neurogénese através da ativação da fosfatidilinositol-3-cinase (PI-3K), Akt (ou proteína cinase B, PKB) e MAP cinase, vias de sinalização intracelular que regulam a ação dos fatores de pró-sobrevivência e expressão génica [34].

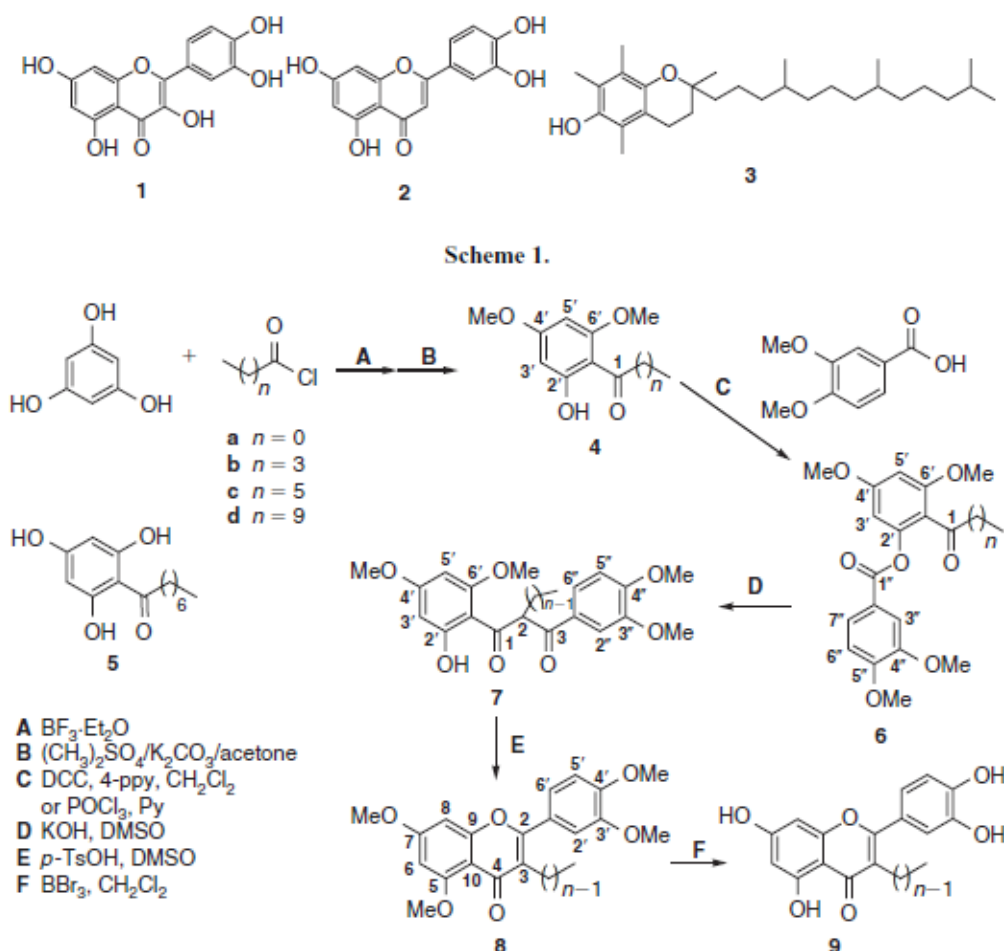
Vários estudos suportam a noção de que existe uma relação entre a atividade da luteolina e a sua estrutura [98, 103, 104], sublinhando a importância da presença de uma unidade catecol no anel B e a presença de grupos 3- e 5-hidroxilo para um eficiente poder antioxidante deste composto [98, 103, 104]. De acordo com estes dados, pensa-se que o poder antioxidante, anti-inflamatório, anti-tumoral e o efeito de modulador da função neuronal das hidroxiflavonas está relacionado com o número e a posição de grupos hidroxilo na molécula [103]. No entanto, apesar de demonstrado que a luteolina pode atuar como agente neuroprotetor e anti-inflamatório em células neuronais, o seu efeito no contexto das doenças neurodegenerativas e mais concretamente da doença de Huntington é ainda desconhecido.

#### **1.4.4 Derivados de luteolina com cadeias 3-álquilo**

Como mencionado na secção anterior (1.4.3), o poder antioxidante e anti-inflamatório das flavonas está relacionado com o seu padrão de hidroxilação. Segundo Seixas *et al.*, (2008) [98] a introdução de cadeias alquílicas em flavonoides parece aumentar a sua propriedade antioxidante. Em particular, estudos recentes revelaram que a introdução de grupos metilo, isopropilo, benzilo ou grupos isoprenilo em flavonas torna-as lipofílicas, podendo aumentar a afinidade destas para a ligação à glicoproteína P, modulando a ação de quimiorresistência de células tumorais. [98]. Esta proteína age como uma bomba de efluxo ATP dependente que transporta fármacos e xenobióticos (compostos químicos estranhos ao organismo ou sistema biológico) para a parte exterior das células [119]. Neste contexto, Seixas *et al.*, (2008) [98] sintetizaram as 3-álquil-3',4',5,7-tetra-hidroxiflavonas (3-álquil-luteolinas) com cadeias alquílicas onde foram introduzidas cadeias com 1, 4, 6 e 10 carbonos (n=1, 4, 6 e 10) (figura 10). Embora ainda não tenham sido testados em muitos modelos celulares, estes derivados da luteolina parecem ter propriedades bioquímicas muito interessantes. Filipe *et al.*, (2009) verificou que os análogos da luteolina inibem a hemólise induzida em eritrócitos por um agente oxidante (*t*-BuOOH). Ainda neste mesmo estudo verificaram que estes compostos inibem a oxidação dos eritrócitos e queratinócitos expostos ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [103]. Além disso, pensa-se que estes compostos possuem um comportamento farmacocinético superior ao de outras polihidroxiflavonas, como a quercetina.

A síntese das 3-álquil-3',4',5,7-tetra-hidroxiflavonas, utilizadas neste trabalho foi efetuada segundo o método de Baker-Venkataraman, após otimização das condições de reação de cada passo, mas em particular na síntese do composto chave 1-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)alcan-1-ona **4**. Em mais pormenor, a síntese deste composto **4** resultou da acilação de Fridel-Crafts do floroglucinol com o cloreto de alcanoílo apropriado, em presença do complexo de BF<sub>3</sub>.EtO<sub>2</sub> como ácido de Lewis, seguida da proteção de dois dos grupos hidroxilo por tratamento com sulfato de metilo em meio alcalino. Seguidamente, procedeu-se à esterificação do ácido 3,4-dimetoxicinâmico com a 2'-hidroxifenona **4**, tendo o ester **6** originado a dicetona **7** após rearranjo de Baker-Venkataraman. Por fim, procedeu-se à ciclização da dicetona **7** com ácido *p*-toluenossulfónico em DMSO, tendo-se obtido os derivados da luteolina **8**. A clivagem dos grupos metilo de **8** por tratamento com

tribrometo de boro originou os pretendidos derivados 3-alkuil-luteolina poli-hidroxilados [98].



**Figura 10 – Esquema representativo da síntese de análogos da luteolina, 3-alkuil-3',-4',-5,-7-tetra-hidroxi-flavonas.** Em 9 estão representadas as 3-alkuil-3',-4',-5,-7-tetra-hidroxi-flavonas em que (n-1) é o local de inserção da cadeia lipofílica (3-alkuil) que forma os derivados da luteolina mediante o número carbonos e hidrogénios adicionados à cadeia. (Seixas *et al.*, 2008 [98]).

## 1.5 Objetivos

Conforme descrito na revisão da literatura, a DH é uma doença neurodegenerativa causada por uma mutação (expansão do trinucleótido CAG) no gene de uma proteína ubíqua, a huntingtina, expressa no nosso organismo. Esta mutação resulta na alteração de múltiplos mecanismos intracelulares que conduzem à disfunção metabólica, disfunção

mitocondrial e stresse oxidativo e morte celular por apoptose. No entanto, não existe uma terapêutica eficazmente capaz de atenuar os processos neurodegenerativos associados à doença.

Neste contexto, vários autores sugerem que os flavonoides, em particular a flavona luteolina apresenta elevado poder antioxidante, estando também descrita como modelador da função neuronal e como supressor de muitas moléculas apoptóticas. No entanto, derivados da 3-alkil-luteolina foram testados em vários modelos biológicos e apresentaram capacidades biológicas e antioxidantes mais relevantes do que a própria luteolina.

Com base nas evidências descritas, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade neuroprotetora de derivados de 3-alkil-luteolina com cadeias alquílicas onde foram introduzidas cadeias com 1, 4, 6 e 10 carbonos ( $n=1, 4, 6$  e  $10$ ), designados por Lut-C<sub>1</sub>, Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub>, respetivamente. O efeito neuroprotetor destes compostos foi determinado a nível do stresse oxidativo e dos mecanismos de morte por apoptose, através da análise da citotoxicidade, quantificação de peróxidos intracelulares e determinação da atividade da caspase-3, assim como da análise de proteínas pró- e anti-apoptóticas (Bax, Bcl-2 e AIF, do inglês “apoptosis inducing factor”) após seleção de um dos compostos com efeitos protetores. Para tal, utilizou-se uma linha celular neuronal, STHdh, obtida do estriado de murganhos *knock-in* homozigóticos que expressam a mutação da huntingtina com 111 glutaminas (STHdh<sup>111/111</sup> ou Q<sub>111</sub>) *versus* células normais que expressam a huntingtina *wild type* com 7 glutaminas (STHdh<sup>7/7</sup> ou Q<sub>7</sub>) derivada de murganhos controlo.



# Capítulo II

---

## Material e Métodos



## 2. Material e Métodos

### 2.1 Materiais

O meio de cultura DMEM, do inglês “Dulbecco’s modified Eagle’s medium”), penicilina/estreptomicina, soro bovino fetal (FBS) e geneticina foram obtidos da *GIBCO* (Paisley, Reino Unido). A albumina de soro bovino (BSA), ditioneitol (DTT), o fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF), o ácido 3-(ciclo-hexilamino)-1-(propanosulfônico) (CAPS), TWEEN, a tetrametiletenodiamina (TEMED), o ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfônico (HEPES), o azul tripano (0,4%), os inibidores de proteases (leupeptina, pepstatina A, quimostatina e antipaina), o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), a resazurina e o anticorpo anti- $\beta$ -actina foram adquiridos à *Sigma Aldrich Co.* (St Louis, MO, EUA). A sonda fluorescente diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>) foi proveniente da Molecular Probes (Invitrogen, EUA) e o substrato fluorogénico Ac-Asp-Glu-Val-Asp-ACF (Ac-DEVD-ACF) foi adquirido da empresa *Calbiochem* (Darmstadt, Alemanha). O reagente químico fluorescente, ECF (do inglês, “enhanced chemifluorescence”) e os anticorpos anti-*rabbit* IgG e anti-*mouse* IgG + IgM foram adquiridos à *GE Healthcare* (Little Chalfort, Reino Unido). O reagente Bio-Rad foi proveniente da *Bio-Rad* (Hemel Hempstead, Reino Unido). Os anticorpos anti-Bcl-2 e anti-AIF foram comprados à *Santa Cruz* (California, EUA), o anti-Bax à *Cell Signaling* (Beverly, MA, EUA) e o anti-HSP60 à *Chemicon*. A membrana PVDF foi comprada à *Millipore* (Billerica, MA, EUA). A luteolina foi comprada na empresa *Extrasynthesis* (Genay, França) e os derivados sintéticos da luteolina com cadeias 3-álquilo, que foram designados por Lut-C<sub>1</sub>; Lut-C<sub>4</sub>; Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub>, foram gentilmente cedidos pelo grupo de Química Orgânica da Universidade de Aveiro. Os restantes reagentes utilizados eram os de maior grau analítico disponível para compra.

### 2.2 Culturas celulares

Neste trabalho foram usadas células estriatais provenientes de murganhos *wild type* que expressam a Htt normal - STH $dh^{7/7}$  (Q7) e de murganhos *knock-in* homozigóticos para a Htt mutante, com 111 repetições de glutamina - STH $dh^{111/111}$  (Q111). As células foram

cedidas pela Dr. Marcy E. MacDonald do Departamento de Neurologia do Hospital Geral de Massachusetts, Boston, Estados Unidos da América.

As linhas celulares acima mencionadas foram descongeladas e ampliadas em cultura e em monocamada a 33°C, com CO<sub>2</sub> a 5% e 95% O<sub>2</sub>, em meio DMEM suplementado com FBS a 10%, antibiótico penicilina/estreptomicina a 1%, 10 mM de HEPES, 12 mM de bicarbonato de sódio e 400 µg/ml de geneticina. As linhas celulares foram mantidas em cultura e plaqueadas para ensaios experimentais quando atingiam uma confluência de 70-90%. Para tal, o meio de cultura foi aspirado, as células foram lavadas com um tampão fosfato salino (PBS) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, pH 7,4) e tratadas em seguida com 2 ml de tripsina/EDTA (Sigma), enzima responsável pela desintegração das células através da sua propriedade proteolítica, durante aproximadamente 5 minutos. Após inibição da tripsina por adição de meio DMEM (12 ml), as células foram dissociadas por pipetagens sucessivas de forma a obter uma completa uniformidade celular. Em seguida, procedeu-se à contagem da densidade da suspensão celular utilizando uma solução a 0,4% de azul tripano numa Câmara de Neubauer usando um microscópio ótico (Primo Vert, Zeiss, Alemanha). As células foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços, no caso das experiências de citotoxicidade, da avaliação de peróxidos e da avaliação da atividade da caspase-3; e em placas de 10 cm<sup>2</sup> quando se pretendeu preparar extratos mitocondriais e totais para análise por *Western Blotting*. As linhas celulares foram utilizadas em ensaios experimentais com um número de passagens entre 6 e 22.

### **2.2.1 Avaliação do poder redutor pelo método MTT**

O método de MTT foi utilizado como uma primeira abordagem para a avaliação do poder redutor das linhas celulares STHdh<sup>7/7</sup> e STHdh<sup>111/111</sup> quando tratadas com luteolina ou com os seus derivados sintéticos de 3-alkil-luteolina em várias concentrações. O método em questão é baseado na atividade das desidrogenases (fundamentalmente enzimas mitocondriais), para reduzir o anel tetrazólio do MTT e formar cristais *formazan* de cor azul escura nas células viáveis [120]. Assim, quando na presença de células metabolicamente ativas, o MTT atravessa a membrana celular, e após ser reduzido, forma cristais *formazan* de cor azul escura no citoplasma das células. O número de células vivas é proporcional à quantidade de cristais de *formazan* produzidos [120].

Para este estudo, foi necessária uma suspensão com 110000 células/cm<sup>2</sup> em meio de cultura. Após 24h, as células foram tratadas com diferentes concentrações das flavonas luteolina, Lut-C<sub>1</sub>, Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub> (0,1; 1; 10; 25; 50 µM). Para cada uma das concentrações dos compostos testados, a viabilidade celular foi avaliada após 24 horas.

Depois de terminado o período de incubação, procedeu-se à remoção do meio de cultura, à lavagem das células com PBS e à adição de solução de MTT a 0,5 mg/ml em meio de Krebs (135 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 0,4 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,8 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1 mM de MgSO<sub>4</sub>, 20 mM de HEPES e 5,5 mM de glucose). Após a incubação a 33°C por um período de 2 horas, de forma a permitir a redução do MTT pelas células viáveis, procedeu-se à solubilização dos cristais de *formazan* por adição de isopropanol em 0,04 M de ácido clorídrico. O poder redutor das células foi determinado pela medição espectralométrica da solução que contém os cristais solubilizados que absorvem a 545 nm, no espectralómetro SpectraMax Plus 384. Os resultados foram expressos em percentagem relativamente à absorvência determinada nas células controlo (presença de veículo e ausência de flavona) segundo a fórmula: [(A<sub>545</sub>) células tratadas / (A<sub>545</sub>) células controlo] x 100.

### **2.2.2 Avaliação do poder redutor da resazarina**

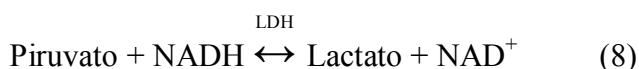
O poder redutor das células estriatais STHdh<sup>7/7</sup> e STHdh<sup>111/111</sup>, na ausência ou presença das flavonas luteolina, Lut-C<sub>1</sub>, Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub> foi igualmente avaliado pelo método colorimétrico de Alamar *blue*. Este ensaio é baseado na deteção de células metabolicamente ativas dependentes da atividade das desidrogenases que produzem formas reduzidas de coenzimas (por exemplo NADH). A resazurina, o agente ativo do reagente Alamar, é um composto permeável que na presença de células metabolicamente ativas é reduzido a resofurina, um composto de cor púrpura [100].

As células foram plaqueadas e tratadas com as flavonas em condições idênticas às descritas na secção anterior. Após terminar o período de incubação, procedeu-se à remoção do meio de cultura celular e adicionou-se Alamar *blue* (1 mg/ml) diluído em meio de Krebs. Após a adição de Alamar *blue*, as células foram incubadas a 33°C por um período de 1 hora e 30 minutos. Ao fim desse tempo, a absorvência foi quantificada espectralometricamente a 570 nm e a 600 nm no leitor de placas SpectraMax Plus 384, e os resultados foram expressos em percentagem relativamente à absorvência determinada

nas células controlo segundo a fórmula:  $[(A_{570}-A_{600}) \text{ células tratadas} / (A_{570}-A_{600}) \text{ células controlo}] \times 100$ .

### **2.2.3 Quantificação da libertação de LDH**

A viabilidade das linhas celulares *STHdh*<sup>7/7</sup> e *STHdh*<sup>111/111</sup>, na presença de várias concentrações de luteolina, Lut-C<sub>1</sub>, Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub>, foi avaliada pelo método de análise da libertação da enzima citosólica LDH (do inglês “lactate dehydrogenase” ou lactato desidrogenase), que catalisa a conversão reversível de piruvato em lactato. O teste LDH baseia-se na medição da absorvência da oxidação de dinucleótido de nicotinamida adenina reduzido (NADH) a dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD<sup>+</sup>) pela LDH, a 340nm (reação 8) [121]. Esta enzima está amplamente distribuída no citoplasma, e é libertada para o meio extracelular após uma lesão membranar. Assim, quanto maior a perda de integridade membranar, maior o sinal espectrofotométrico. Se não ocorrer dano membranar, a LDH permanece intracelularmente.



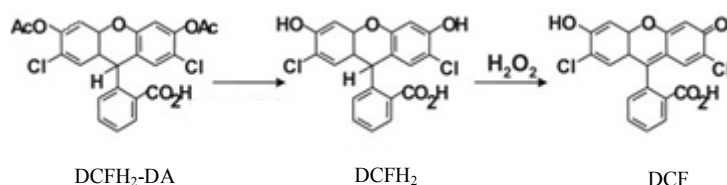
Para este ensaio, as linhas celulares foram plaqueadas e tratadas com as flavonas, de forma semelhante ao descrito na secção 2.2.1. Após 24 horas de tratamento com as flavonas, o meio de cultura foi recolhido para posterior avaliação da atividade extracelular de LDH, enquanto as células aderentes foram tratadas de forma a quantificar a atividade intracelular da enzima. As células foram lisadas em HEPES a 10 mM e a pH 7,4 contendo triton X-100 a 0,5%, tendo o processo de lise sido assegurado por 2 ciclos de congelação/descongelação. De seguida, as frações intracelulares foram recolhidas para tubos *eppendorfs*. Todas as amostras foram centrifugadas na centrífuga 5417R (*Eppendorf*) a 14000 rpm durante 10 min a 4°C, e os respetivos sobrenadantes foram guardados a -80°C até se proceder à leitura da atividade da LDH.

Para a leitura espectrofotométrica da atividade extra e intracelular de LDH, 6,45 µl de cada sobrenadante foi distribuído pelos poços de uma placa de 96 poços, aos quais se adicionaram 9,76 mM de piruvato. A reação foi iniciada com a adição de 0,24 mM de NADH. Para as amostras controlo (brancos), o NADH foi substituído por uma solução Tris/NaCl. A atividade da LDH foi determinada por leitura no espectrofotómetro

SpectraMax Plus 384, medindo a taxa de conversão do NADH a NAD<sup>+</sup>, a 340 nm. A LDH libertada no meio extracelular foi calculada em percentagem da atividade de LDH total das células [% de LDH libertada = LDH extracelular / (LDH extracelular + LDH intracelular)].

#### 2.2.4 Quantificação de peróxidos intracelulares

A análise de espécies reativas de oxigénio foi efetuada pela marcação das células *STHdh*<sup>7/7</sup> e *STHdh*<sup>111/111</sup> com a sonda diacetato de 2',7'-diclorodi-hidrofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>-DA), um composto lipossolúvel, estável e não fluorescente. Ao entrar nas células, a ligação estabelecida entre o DCFH<sub>2</sub> e o grupo DA é hidrolisada por esterases intracelulares não específicas originando a 2',7'-diclorodi-hidrofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>) que fica retido no interior da célula. Na presença de peróxidos, a DCFH<sub>2</sub> é oxidada a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), um composto altamente fluorescente (Figura 11) [122].



**Figura 11 – Formação do DCF a partir do DCFH<sub>2</sub>-DA.** O composto lipossolúvel e não fluorescente DCFH<sub>2</sub>-DA é hidrolisado por esterases intracelulares originando o DCFH<sub>2</sub> que, por sua vez, aquando na presença de peróxidos intracelulares é oxidado a DCF, um composto altamente fluorescente. (Adaptado de Kotamraju *et al.*, 2004 [123]).

Para este estudo, as células foram plaqueadas e sujeitas a tratamento com as flavonas em condições semelhantes às descritas anteriormente.

Após o período de incubação de 24 horas, o meio de cultura foi aspirado e procedeu-se à lavagem das células com PBS. De seguida, as células foram incubadas com uma solução 20 µM de DCFH<sub>2</sub>-DA em meio Krebs, durante 45 minutos, a 33°C. Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS, e colocadas em meio Krebs para a leitura da fluorescência, na ausência de sonda fluorescente.

A formação de peróxidos nas linhas celulares *STHdh*<sup>7/7</sup> e *STHdh*<sup>111/111</sup> foi determinada pela medição fluorimétrica da ligação do composto fluorescente DCF às ROS

que emite fluorescência a 530 nm, após excitação no comprimento de onda de 488 nm, durante 1 hora a 33°C. Os valores de fluorescência obtidos para cada condição foram corrigidos para os valores de proteína em cada poço (determinada pelo método *BioRad*, secção 2.2.6), expressos em unidades relativas de fluorescência por minuto e por mg de proteína para cada condição e de seguida expressos em percentagem relativamente às células controlo (Q<sub>7</sub>).

### **2.2.5 Avaliação da atividade da caspase-3**

A avaliação caspase-3 foi determinada usando um substrato fluorimétrico, que consiste num péptido Asp-Glu-Val-Asp (DEVD), ligado ao fluoróforo 7-amino-4-trifluorometil cumarina (ACF). Quando ativada, a caspase-3 hidrolisa o tetrapéptido, libertando o ACF fluorimétrico que é quantificado por análise fluorimétrica (DEVD-ACF) [124].

As células foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços e mantidas em cultura em condições equivalentes às anteriormente descritas (secção 2.2.1). Após 24 horas procedeu-se ao tratamento com as flavonas, tal como anteriormente descrito, e as células foram mantidas em cultura por um período de 24 horas. Findo esse tempo, o meio das culturas foi aspirado e as células foram lavadas com PBS. De seguida estas foram lisadas a 4°C com um tampão constituído por 25 mM de HEPES, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, a pH 7,5, e suplementado com 2 mM de DTT (este último foi usado para prevenir a formação de ligações intra e intermoleculares de dissulfeto entre resíduos de cisteína), 0,1 mM de PMSF, inibidores de proteases (1 µg/ml) (reage com resíduos de serina para inibir por exemplo a tripsina, e inibe também as proteases de cisteína) e triton X-100 a 0,04%. O extrato foi deixado em repouso a 4°C durante aproximadamente 30 minutos, de forma a permitir maior permeabilização membranar. De seguida, foi adicionado um tampão de reação (25 mM HEPES, sacarose a 10%, CHAPS a 0,1%), pH 7,5), suplementado com 2 mM DTT e 15 µM Ac-DEVD-ACF.

A fluorescência do ACF foi medida durante 1:30 h, a 33°C de forma a manter a atividade enzimática (Excitação: 400 nm; emissão: 505 nm) no fluorímetro de placas SpectraMax Gemini: EM (Molecular Devices, EUA). Os valores de fluorescência obtidos para cada condição foram corrigidos para os valores de proteína (quantificados pelo método de *BioRad*, secção 2.2.6), expressos em unidades relativas de fluorescência por



minuto e por mg de proteína para cada condição e, de seguida expressos em percentagem em relação às células controlo (Q<sub>7</sub>).

### 2.2.6 Quantificação da proteína pelo método *Bio-Rad*

O método Bio-Rad é um procedimento simples e preciso de quantificação da concentração de proteína solubilizada. Neste método a mudança diferencial de cores do corante azul brilhante (do inglês, “Brilliant blue G”), ocorre em resposta a várias concentrações de proteína [103]. A reta de calibração foi preparada segundo a Tabela 1.

**Tabela 1 – Representação esquemática do modo de preparação da reta de calibração.** A reta de calibração foi preparada adicionando 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 µl de BSA 0,1% individualmente a cada poço. Ao padrão BSA foi adicionado 10 µl de solução tampão e 120 µl de reagente Bio-RAD. O volume final (200 µl/poço) foi ajustado adicionando água ultra-pura. Todo o procedimento foi realizado em triplicado.

N.º do tubo	H <sub>2</sub> O (µl)	TL / Krebs (µl)	BSA 0,1% (µl)	Reagente Bio –RAD (µl)	µg/µl de proteína
1	70	10	----	120	=0
2	69	10	1	120	=1
3	68	10	2	120	=2
4	67	10	3	120	=3
5	66	10	4	120	=4
6	65	10	5	120	=5
7	64	10	6	120	=6

Para a quantificação da proteína nas amostras para avaliação dos peróxidos e da atividade da caspase-3 foi adicionado em cada poço, 25 e 15 µl de amostra (respetivamente), 45 e 55 µl de água destilada (respetivamente) e 120 µl de reagente Bio-Rad. Enquanto para a quantificação da proteína nas amostras mitocondriais e totais foi adicionado em cada poço, 1 µl de amostra, 1 µl de tampão, 78 µl de água destilada e 120 µl de reagente Bio-Rad. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente e num

local protegido de luz, a densidade ótica foi medida a 545nm no espectrofotómetro SpectraMax Plus 384.

### **2.2.7 Western blotting**

#### **2.2.7.1 Recolha de extratos totais**

Para a análise da expressão das linhas celulares (STHdh<sup>7/7</sup> e STHdh<sup>111/111</sup>), as células foram plaqueadas em placas de cultura com uma densidade de 300000 células/cm<sup>2</sup>, em 7 ml de meio de cultura DMEM suplementado e foram mantidas em cultura, em condições equivalentes às anteriormente descritas (em 2.2.1). O tratamento das células com as flavonas, luteolina (0,1 µM) e Lut-C<sub>6</sub> (10 e 25 µM) foi efetuado ao fim de 24 horas de cultura e teve a duração de 24 horas tal como descrito anteriormente.

No final do tratamento com as flavonas (ou com veículo na condição do controlo), o meio de cultura foi aspirado e as células raspadas com um tampão de lise constituído por 25 mM de HEPES, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, a pH 7,5 e suplementado com 2 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 1 µg/ml de inibidores de proteases e 0,1% Triton X-100. A suspensão celular foi sujeita a três ciclos de congelação/descongelação e de seguida foram centrifugadas na centrífuga 5417R (*Eppendorf*) a 14000 rpm, durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante da centrifugação foi recolhido em tubos *eppendorf* e as amostras foram guardadas a -80°C até serem analisadas.

#### **2.2.7.2 Recolha de extratos mitocondriais**

Após o tratamento com as flavonas (ou veículo na condição controlo), o meio de cultura foi aspirado e as células raspadas com 500 µl de tampão de sacarose a 250 mM com HEPES 20 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, EDTA 1 mM e EGTA 1 mM, pH 7,4, suplementado com 1 mM DTT, 100 µM PMSF, 1 µg/ml inibidores de proteases. A homogeneização foi, em seguida, centrifugada a 2300 rpm, durante 12 minutos, a 4°C e o sobrenadante (fração total) foi recolhido para tubos *eppendorf* e novamente centrifugado a 10600 rpm, durante 20 min, a 4°C. O sedimento resultante desta centrifugação (fração mitocondrial) foi ressuspensionado em meio de sacarose suplementado (proteínas mitocondriais).

### **2.2.7.3 Anticorpos primários e secundários**

Como anticorpos primários foram usados a *rabbit* anti-Bax (1:1000); *rabbit* Bcl-2 (1:500); *mouse* AIF (1:1000) e *mouse* HSP60 (1:1000) e *mouse* actina- $\beta$  (1:1000), os dois últimos usados como anticorpos de referência para as frações mitocondriais e totais, respetivamente.

Os anticorpos secundários utilizados foram o anti-*rabbit* IgG (1:40000) e anti-*mouse* IgG+IgM (1:20000).

### **2.2.7.4 Eletroforese, transferência e revelação das membranas**

As amostras das frações celulares correspondentes a 20  $\mu$ g de proteína foram sujeitas à quantificação por SDS/PAGE (12%). As proteínas separadas desta forma foram em seguida transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Após bloqueio destas membranas com leite magro a 5% diluído em TBS-T a 10% (TBS constituído por Tris-HCl 25mM, NaCl 150 mM a pH 7,6 suplementado com 2 ml de Tween 20) durante 2 horas à temperatura ambiente, as membranas foram incubadas com os anticorpos acima mencionados, em agitação constante, durante a noite, a 4°C. De seguida, as membranas foram lavadas duas vezes com TBS-T a 10%, durante 30 minutos e posteriormente incubadas com os anticorpos secundários durante 60 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente as membranas foram reveladas usando o reagente quimiofluorescente ECF, um composto que pela ação da fosfatase alcalina que se encontra ligada ao anticorpo secundário é convertido num composto muito fluorescente. As bandas imunorreativas foram visualizadas no VersaDoc Imaging System (BioRad, Hercules, EUA) e a quantificação da densidade de cada banda foi analisada usando o *software* QuantityOne. Os dados da expressão proteica correspondem à razão de cada proteína vs proteína de referência, e foram expressos em % do controlo.

## **2.3 Análise estatística**

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  S.E.M (do inglês “Standard error of the mean”) do número de experiências independentes, realizadas em duplicado ou triplicado,

tal como especificado na legenda das figuras. A análise estatística foi realizada pelo teste de análise de variância, (two-way-ANOVA) seguida do teste de *Bonferroni*, para comparação de múltiplos grupos. Para comparações entre dois grupos foi usado o *Student's t-test*, usando o programa GraphPad Prism. O valor  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

# Capítulo III

---

## Resultados



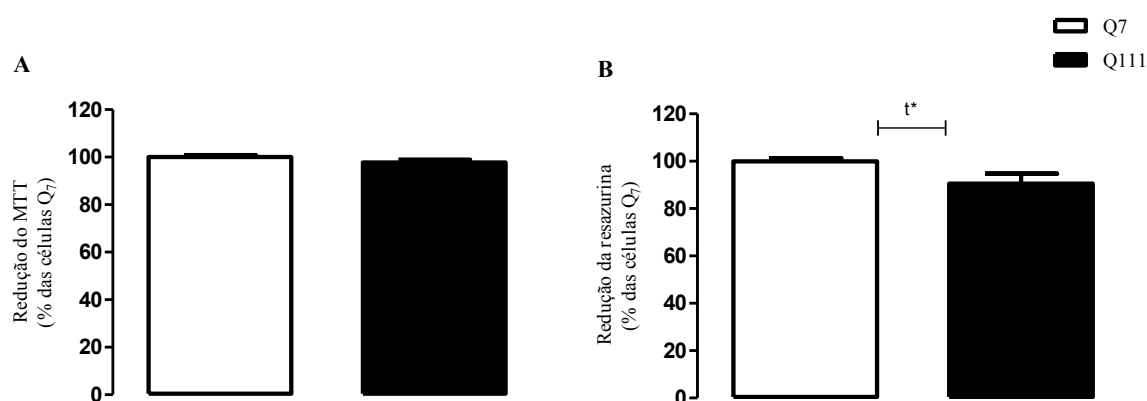
### 3. Resultados

Como anteriormente mencionado, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade neuroprotetora de derivados de 3-alquil-luteolina (Lut-C<sub>1</sub>, Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub>, Lut-C<sub>10</sub>) numa linha neuronal obtida do estriado de murganhos *knock-in* homozigóticos para a mutação da huntingtina (STHdh<sup>111/111</sup> ou Q<sub>111</sub>) *versus* células *wild type* (WT) (STHdh<sup>7/7</sup> ou Q<sub>7</sub>). Assim, numa primeira fase avaliou-se a citotoxicidade dos compostos nas duas linhas celulares numa gama alargada de concentrações, bem como a proteção ao nível da produção intracelular de peróxidos e da atividade da caspase-3. Paralelamente analisou-se o efeito protetor da luteolina, de forma a comparar os efeitos dos substituintes 3-alquilo na atividade dos compostos sintéticos, relativamente aos obtidos para o composto natural. Com base nos resultados obtidos em alguns destes testes, o composto Lut-C<sub>6</sub> foi selecionado para avaliação do seu efeito ao nível das proteínas apoptóticas (rácio Bax/Bcl-2 e análise da proteína AIF) em extratos totais e mitocondriais, respetivamente.

#### **3.1 Efeito da luteolina e dos seus derivados 3-alquilo na capacidade redutora das células**

Para avaliar a possível proteção da luteolina e dos seus derivados 3-alquilo nas linhas celulares Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub>, foi analisado o poder citotóxico da luteolina e dos seus derivados recorrendo à avaliação da capacidade redutora das células pelos métodos de MTT e Alamar *blue*. Estes ensaios foram realizados utilizando uma gama de concentrações das flavonas de 0,1 a 50 µM, seguindo os procedimentos descritos em 2.2.1 e 2.2.2.

Em condições basais, a capacidade redutora das células Q<sub>111</sub>, medida pelo teste de MTT, não foi significativamente diferente comparativamente às células Q<sub>7</sub> (Figura 12A). Contudo, a redução da resazurina foi significativamente menor na linha celular mutante (90,6±4,1%), quando comparada com a linha celular do tipo selvagem (Figura 12B).

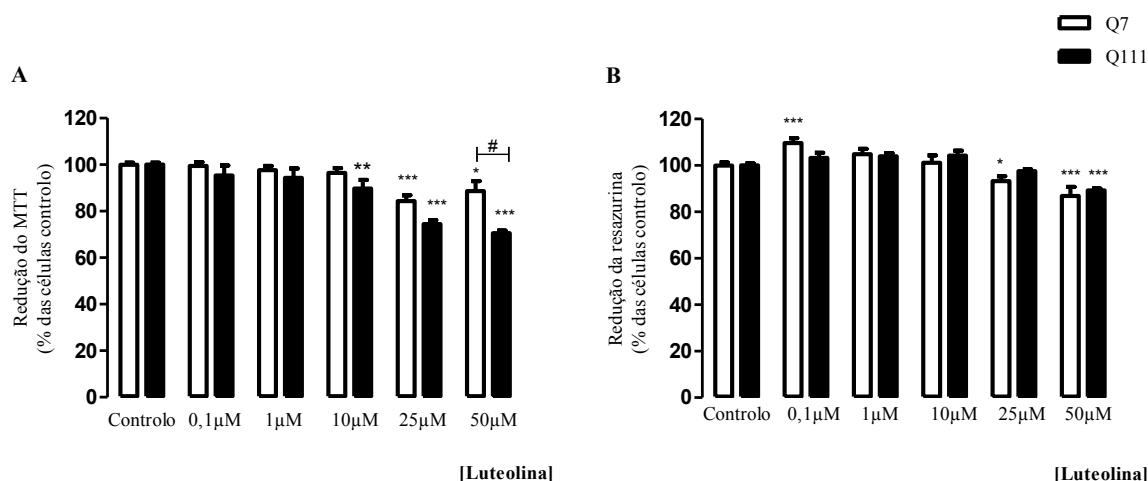


**Figura 12 – Redução do MTT (A) e da resazurina (B) nas linhas celulares estriatais *STHdh*<sup>7/7</sup> (Q<sub>7</sub> – células do tipo selvagem) e *STHdh*<sup>111/111</sup> (Q<sub>111</sub> - células mutantes) em condições basais.** Os resultados foram expressos em percentagem das células Q<sub>7</sub> (controlo). Os resultados representam a média ± SEM de 7 experiências independentes realizadas em quadruplicado. Análise estatística: t\**p*<0,05 células Q<sub>111</sub> versus células Q<sub>7</sub>.

Em relação ao teste de MTT, a luteolina afetou a capacidade redutora das células Q<sub>111</sub> para concentrações de 10, 25 e 50  $\mu$ M (89,8±3,7; 74,4±1,8 e 70,5±1,1% do controlo, respetivamente) (Figura 13A). As duas linhas celulares mostraram um efeito semelhante (não significativo) nos diversos tratamentos com luteolina, com exceção da luteolina a 50  $\mu$ M, em que as células Q<sub>111</sub> apresentaram menor capacidade de redução do MTT comparativamente às células Q<sub>7</sub>.

Em relação ao ensaio colorimétrico de Alamar *blue*, não foram observadas alterações significativas da capacidade redutora nas células Q<sub>7</sub> quando tratadas com concentrações de luteolina de 1 e 10  $\mu$ M (104,9±2,3 e 101,2±3,2% do controlo, respetivamente). No entanto, foi observado um aumento significativo da capacidade redutora das células Q<sub>7</sub> após tratamento com luteolina (0,1  $\mu$ M) (109,7±2,1% do controlo). Neste teste apenas se observou uma diminuição significativa da capacidade redutora das células Q<sub>7</sub> quando tratadas com 25  $\mu$ M de luteolina e nas células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub> quando tratadas com luteolina, numa concentração de 50  $\mu$ M (86,9±3,9 e 89,3±0,8% do controlo, respetivamente).

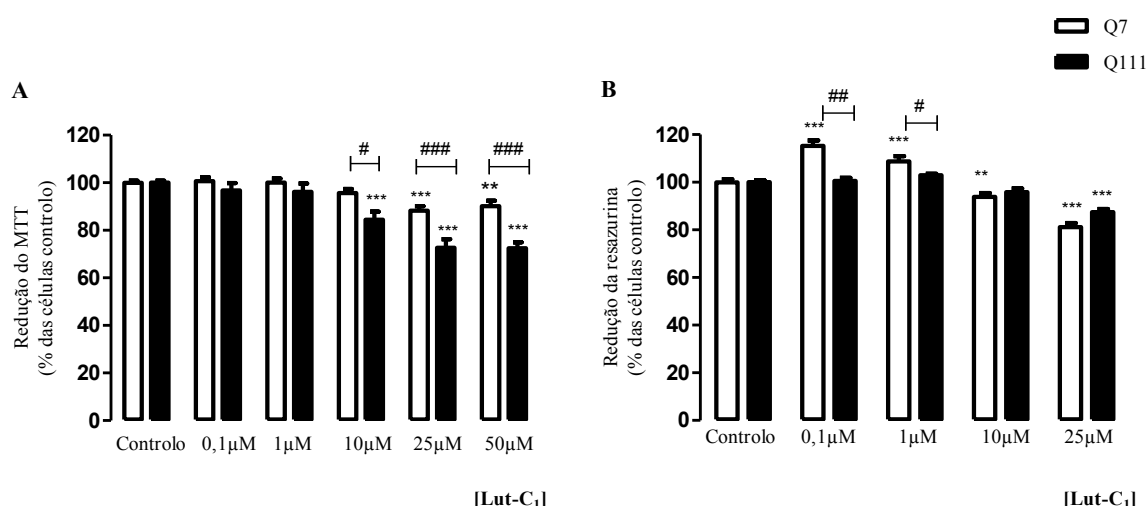




**Figura 13 – Efeito da luteolina na redução do MTT (A) e na redução da resazurina (B) nas linhas celulares estriatais *STHdh*<sup>7/7</sup> (Q<sub>7</sub> - células do tipo selvagem) e *STHdh*<sup>111/111</sup> (Q<sub>111</sub> - células mutantes).** As linhas celulares foram tratadas com 0,1; 1; 10; 25 e 50 μM de luteolina, durante 24 horas a 33°C, e os resultados foram expressos em percentagem das células controlo (Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub>). Os resultados representam a média ± SEM de 7 experiências independentes realizadas em quadruplicado. Análise estatística: \**p*<0,05; \*\**p*<0,01; \*\*\**p*<0,001, relativamente às células controlo, #*p*<0,05 quando comparadas as células Q<sub>111</sub> e Q<sub>7</sub> para a mesma condição experimental.

No geral, o tratamento das células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub> com o derivado da luteolina que contém um grupo 3-metilo (designado por Lut-C<sub>1</sub>), induziu um efeito semelhante ao observado para a luteolina no teste de MTT (Figura 14A).

Quando expostas a concentrações baixas de Lut-C<sub>1</sub> (0,1 e 1 μM) verificou-se um aumento da capacidade redutora da resazurina nas células Q<sub>7</sub> em relação à observada em condições basais (115,3±2,3 e 108,8±2,2% do controlo, respetivamente) (Figura 14B). A capacidade redutora da resazurina nas células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub> apresentou-se diminuída após tratamento com Lut-C<sub>1</sub> a 25 μM (81,1±1,7 e 87,5±1,3% do controlo, respetivamente) (Figura 14B).

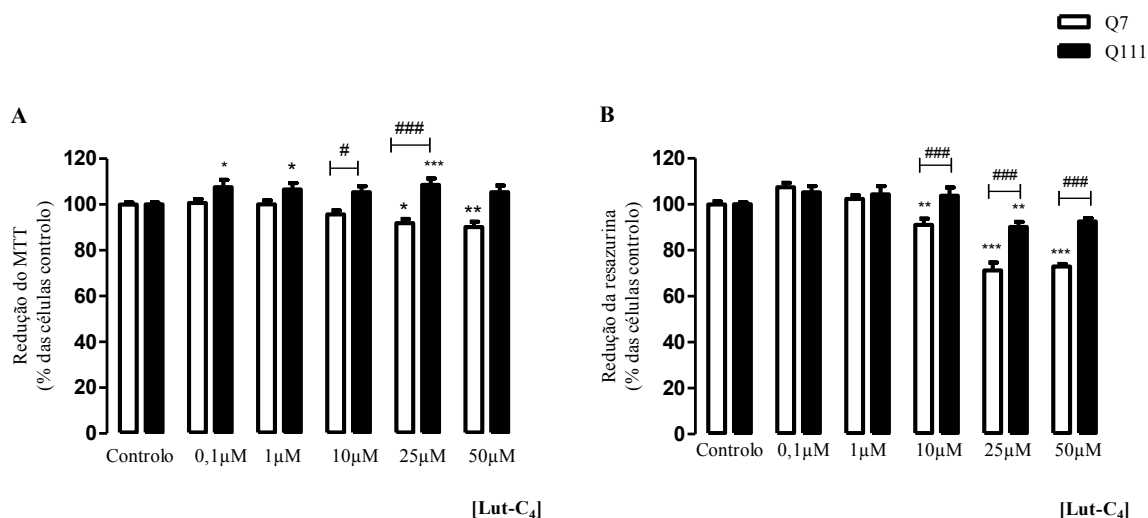


**Figura 14 – Efeito do Lut-C<sub>1</sub> na redução do MTT (A) e da redução da resazurina (B) nas linhas celulares estriatais *STHdh*<sup>7/7</sup> (Q<sub>7</sub> - células do tipo selvagem) e *STHdh*<sup>111/111</sup> (Q<sub>111</sub> - células mutantes).** As linhas celulares foram tratadas com 0,1; 1; 10; 25 e 50 μM de Lut-C<sub>1</sub>, durante 24 horas a 33°C, e os resultados foram expressos em percentagem das células controlo (Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub>). Os resultados representam a média ± SEM de 7 experiências independentes realizadas em quadruplicado. Análise estatística: \*\**p*<0,01; \*\*\**p*<0,001, relativamente às células controlo, #*p*<0,05; ###*p*<0,01; ####*p*<0,001 quando comparadas as células Q<sub>111</sub> e Q<sub>7</sub> para a mesma condição experimental.

Como pode ser observado na figura 15, o efeito da Lut-C<sub>4</sub> foi claramente distinto do da luteolina e de Lut-C<sub>1</sub>. Em relação ao ensaio MTT, foi possível verificar que o composto não induziu redução da capacidade redutora das células Q<sub>111</sub> na gama de concentrações de 0,1 a 50 μM, tendo mesmo sido verificado um aumento desta capacidade em algumas das concentrações testadas (10 e 25 μM) (105,3±2,6 e 108,5±2,8% do controlo, respetivamente). Por outro lado, o tratamento das células Q<sub>7</sub> com Lut-C<sub>4</sub> levou à diminuição da sua capacidade redutora para a concentração 25 e 50 μM (91,9±1,8 e 90,2±2,3% do controlo, respetivamente) (Figura 15A). Desta forma, os resultados obtidos pelo teste MTT indicaram que o composto Lut-C<sub>4</sub> afeta de forma distinta as células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub>, em relação à capacidade redutora do MTT.

O ensaio de Alamar *blue* mostrou uma diminuição da capacidade redutora da resazurina nas células Q<sub>7</sub> quando tratadas com as concentrações 10, 25 e 50 μM de Lut-C<sub>4</sub> (91,1±2,7; 71,2±3,4 e 72,9±1,1% do controlo, respetivamente). As células mutantes apresentaram aumento da redução da resazurina para as concentrações 0,1, 1 e 10 μM,

embora sem significância estatística. Em conjunto, os resultados obtidos pelos ensaios de MTT e Alamar *blue*, indicam que as células WT são mais sensíveis a este derivado da luteolina do que as células que expressam a Htt mutante.

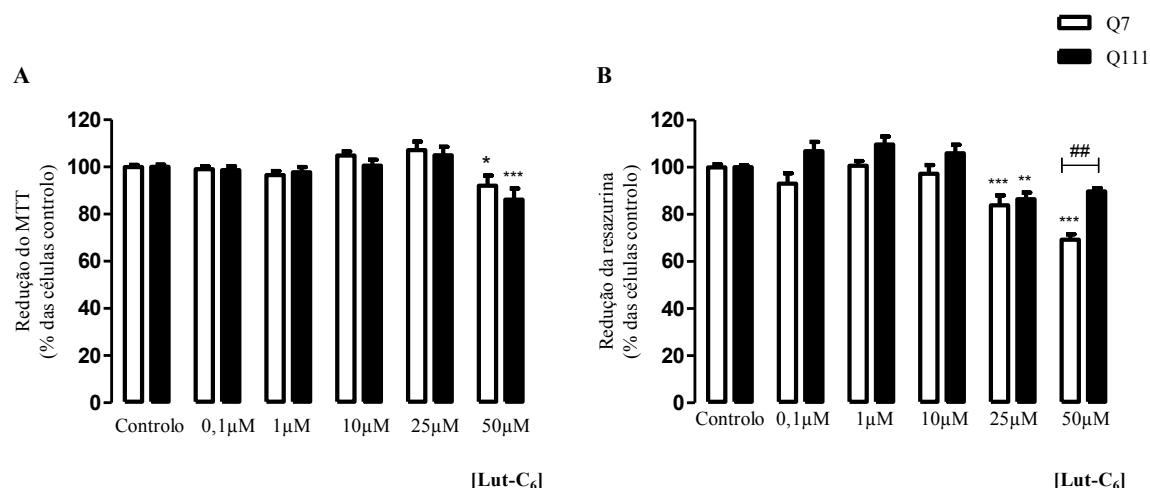


**Figura 15 – Efeito do Lut-C<sub>4</sub> na redução do MTT (A) e na redução da resazurina (B) nas linhas celulares estriatais *STHdh*<sup>7/7</sup> (Q<sub>7</sub> - células do tipo selvagem) e *STHdh*<sup>111/111</sup> (Q<sub>111</sub> - células mutantes).** As linhas celulares foram tratadas com 0,1; 1; 10; 25 e 50 μM de Lut-C<sub>4</sub>, durante 24 horas a 33°C, e os resultados foram expressos em percentagem das células controlo (Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub>). Os resultados representam a média ± SEM de 7 experiências independentes realizadas em quadruplicado. Análise estatística: \**p*<0,05; \*\**p*<0,01; \*\*\**p*<0,001, relativamente às células controlo, #*p*<0,05 e ###*p*<0,001 quando comparadas as células Q<sub>111</sub> e Q<sub>7</sub> para a mesma condição experimental.

Em relação ao derivado da luteolina que contém um grupo 3-hexilo (e assim designado por Lut-C<sub>6</sub>) os resultados obtidos pelo método MTT indicaram que este composto tem uma ação similar nas duas linhas celulares. Este composto provocou uma diminuição significativa da capacidade redutora nas células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub> apenas quando tratadas com uma concentração de 50 μM (92,0±4,3 e 86,1±4,7% do controlo, respetivamente) (Figura 16A). De notar ainda, uma tendência positiva da capacidade redutora do MTT em ambas as linhas celulares após tratamento com Lut-C<sub>6</sub> (10 e 25 μM).

Os resultados do ensaio colorimétrico do Alamar *blue*, para o Lut-C<sub>6</sub> foram distintos dos obtidos pelo teste do MTT. Claramente, o Lut-C<sub>6</sub> induziu um aumento da capacidade redutora, preferencialmente, na linha celular mutante tratada com as

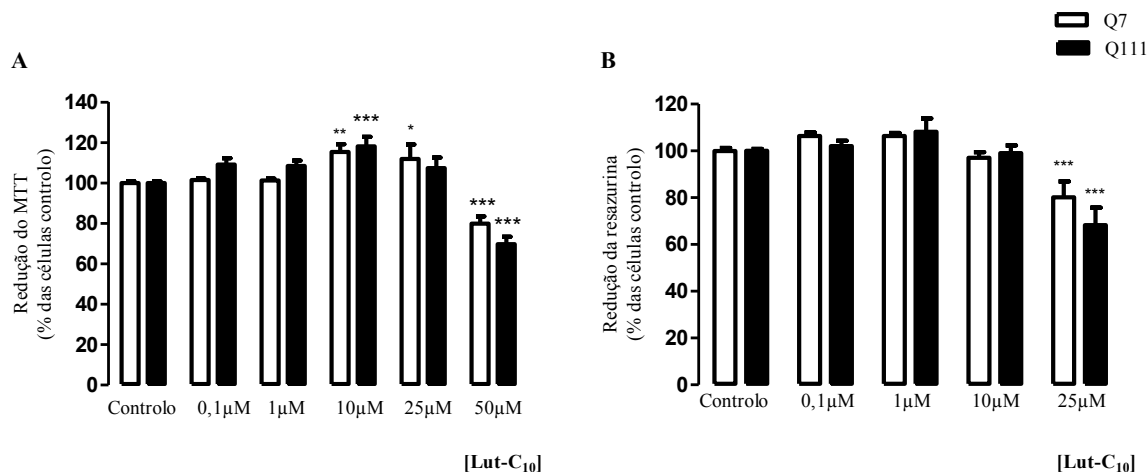
concentrações de 0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$ , embora estatisticamente sem significância. Notou-se ainda que este composto diminuiu a capacidade redutora nas células  $Q_7$  na presença das concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  ( $83,8 \pm 4,3$  e  $69,2 \pm 2,3\%$  do controlo, respetivamente). Esta redução foi também observada nas células  $Q_{111}$  após tratamento com Lut- $C_6$  (25  $\mu\text{M}$ ) ( $86,5 \pm 2,8\%$  do controlo) (Figura 16B).



**Figura 16 – Efeito do Lut- $C_6$  na redução do MTT (A) e na redução da resazurina (B) nas linhas celulares estriatais  $STHdh^{7/7}$  ( $Q_7$  - células do tipo selvagem) e  $STHdh^{111/111}$  ( $Q_{111}$  - células mutantes).** As linhas celulares foram tratadas com 0,1; 1; 10; 25 e 50  $\mu\text{M}$  de Lut- $C_6$ , durante 24 horas a 33°C, e os resultados foram expressos em percentagem das células controlo ( $Q_7$  e  $Q_{111}$ ). Os resultados representam a média  $\pm$  SEM de 7 experiências independentes realizadas em quadruplicado. Análise estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , relativamente às células controlo, ## $p < 0,01$  quando comparadas as células  $Q_{111}$  e  $Q_7$  para a mesma condição experimental.

Relativamente ao derivado da luteolina Lut- $C_{10}$ , apesar de ser evidente um aumento da capacidade redutora de MTT para concentrações 0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$ , esse aumento foi apenas estatisticamente significativo para a concentração de 10  $\mu\text{M}$  nas duas linhas celulares ( $115,3 \pm 3,9$  e  $118,1 \pm 4,7\%$  do controlo, respetivamente para as células  $Q_7$  e  $Q_{111}$ ) e de 25  $\mu\text{M}$  nas células  $Q_7$  ( $111,9 \pm 7,1\%$  do controlo). Em oposição, o aumento da concentração de Lut- $C_{10}$  (50  $\mu\text{M}$ ) provocou uma diminuição na capacidade redutora em ambas as linhas celulares ( $79,9 \pm 3,6$  e  $69,7 \pm 3,7\%$  do controlo, respetivamente, para as células  $Q_7$  e  $Q_{111}$ ).

De notar ainda que no ensaio de Alamar *blue*, as células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub> apenas quando tratadas com 25  $\mu$ M Lut-C<sub>10</sub> mostraram uma diminuição significativa da capacidade redutora da resazurina ( $80,2 \pm 6,8$  e  $68,3 \pm 7,4\%$  do controlo, respetivamente) (Figura 17B).



**Figura 17 – Efeito do Lut-C<sub>10</sub> na redução do MTT (A) e na redução da resazurina (B) nas linhas celulares estriatais *STHdh*<sup>7/7</sup> (Q<sub>7</sub> - células do tipo selvagem) e *STHdh*<sup>111/111</sup> (Q<sub>111</sub> - células mutantes).** As linhas celulares foram tratadas com 0,1; 1; 10; 25 e 50  $\mu$ M de Lut-C<sub>10</sub>, durante 24 horas a 33°C, e os resultados foram expressos em percentagem das células controlo (Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub>). Os resultados representam a média  $\pm$  SEM de 7 experiências independentes realizadas em quadruplicado. Análise estatística: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , relativamente às células controlo.

No geral, dos resultados obtidos pelos ensaios MTT e Alamar *blue* foi possível observar que embora os dois testes sejam baseados na atividade de enzimas desidrogenases, os resultados obtidos pelos dois testes foram distintos. Em geral, o ensaio do MTT mostrou uma diminuição da capacidade redutora das células para concentrações inferiores à do Alamar *blue* quando as células foram tratadas com luteolina ou com o derivado da luteolina Lut-C<sub>1</sub>. Por outro lado, nos restantes derivados da luteolina (Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub>) a diminuição da capacidade redutora das células foi mais evidente pelo teste Alamar *blue*.

Analisando os gráficos acima representados, verificou-se ainda que o composto natural luteolina e o Lut-C<sub>1</sub> apresentaram efeitos semelhantes (Figuras 13 e 14); porém, observou-se um aumento da capacidade redutora das células quando tratadas com Lut-C<sub>1</sub> a 0,1 e 1  $\mu$ M. Por outro lado, quando as células foram tratadas com os derivados 3-alquilo

Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub>, o mesmo efeito só foi verificado após exposição a concentrações superiores (1, 10 e 25  $\mu$ M) (Figuras 15, 16 e 17). Em geral, a concentração de 50  $\mu$ M de luteolina ou dos seus derivados induziu um efeito citotóxico.

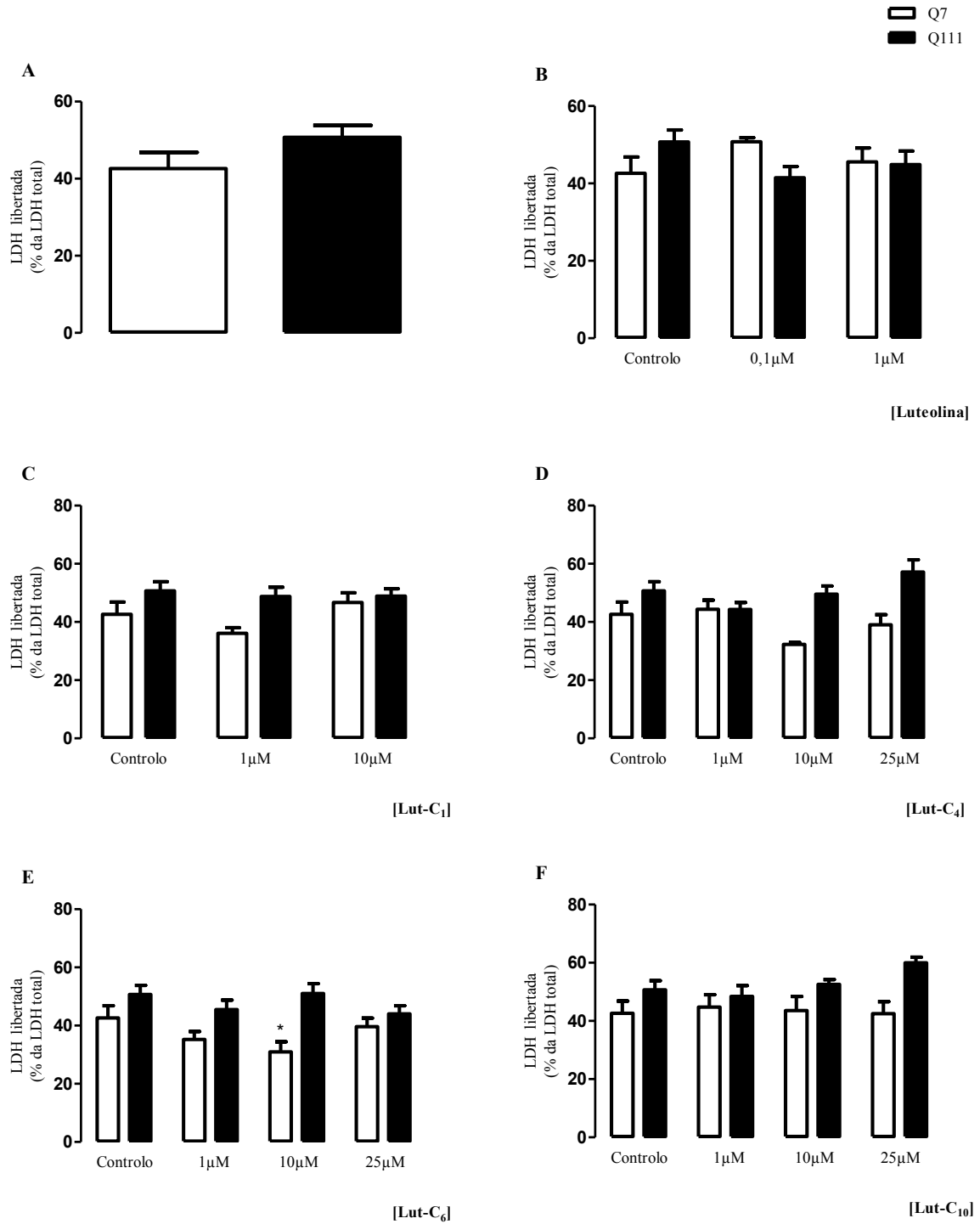
Deve salientar-se que o aumento da capacidade redutora das células, quando medida pelos métodos referidos, poderá ser indicativo de um aumento da viabilidade celular, embora este efeito também possa ser causado por um aumento da proliferação celular (esta hipótese foi refutada com base na visualização microscópica das culturas celulares, após os diversos tratamentos). Assim, no geral, os resultados obtidos pelos testes de capacidade redutora sugerem que os compostos em estudo (luteolina, Lut-C<sub>1</sub>, Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub>) possam ter efeitos benéficos nas linhas celulares Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub>, em algumas das concentrações testadas. Atendendo à disparidade de resultados entre os dois métodos efetuados, e ainda ao facto de que método MTT é o mais representado na literatura [125-127] na avaliação da citotoxicidade de compostos semelhantes aos testados neste trabalho, no geral, foram seleccionadas para a continuação deste estudo as concentrações dos derivados 3-alquil-luteolina que apresentaram um aumento do poder redutor das células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub> através deste método. De notar ainda que para as condições seleccionadas, as células apresentaram morfologia normal, por visualização microscópica (resultados não apresentados).

### **3.2 Efeito da luteolina e dos seus derivados 3-alquilo na libertação de LDH**

Adicionalmente ao poder redutor das células, a neuroprotecção dos compostos foi determinada através da avaliação da integridade membrana, pela análise da libertação de LDH.

Os resultados obtidos mostraram que, em condições basais, a linha celular mutante apresentou um ligeiro aumento ligeiro da libertação da enzima em relação às células Q<sub>7</sub>, embora sem significância estatística (Figura 18A). É importante salientar que os valores da % de LDH libertada nas células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub> sem tratamento (controlo) não foram os esperados, uma vez que neste ensaio os valores foram muito superiores aos verificados noutros estudos realizados no nosso grupo de investigação (Ribeiro e co-autores, resultados não apresentados). Quando tratadas com a luteolina, as células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub> não mostraram alterações significativas de libertação de LDH (Figura 18B). O efeito dos derivados da luteolina (Lut-C<sub>1</sub>, Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub>) nas células, quando avaliada a libertação de

LDH, mostrou ser semelhante às células controlo, na maioria das concentrações testadas (Figura 18C-F). Surpreendentemente foi verificada uma diminuição significativa da libertação de LDH quando as células WT foram tratadas com Lut-C<sub>6</sub> 10µM (30,9±3,5% de LDH total) (Figura 18E).



**Figura 18 – Percentagem de LDH libertada nas linhas celulares estriatais *STHdh*<sup>7/7</sup> (Q<sub>7</sub> - células do tipo selvagem) e *STHdh*<sup>111/111</sup> (Q<sub>111</sub> - células mutantes).** As linhas celulares foram incubadas sem tratamento (A) e com 0,1 e 1 µM de luteolina (B), 1 e 10 µM de Lut-C<sub>1</sub> (C) e 1, 10 e 25 µM de Lut-C<sub>4</sub> (D), Lut-C<sub>6</sub> (E), Lut-C<sub>10</sub> (F) durante 24 horas a 33°C, e os resultados foram expressos em percentagem da LDH total. Os resultados representam a média ± SEM de 4 experiências independentes realizadas em triplicado. Análise estatística: \**p*<0,05 relativamente às células Q<sub>7</sub> (controlo).

Analisando os resultados da figura 18, verifica-se que, de forma análoga à luteolina, a maioria das concentrações testadas dos seus derivados não induziu alterações significativas da integridade membranar nas células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub>.

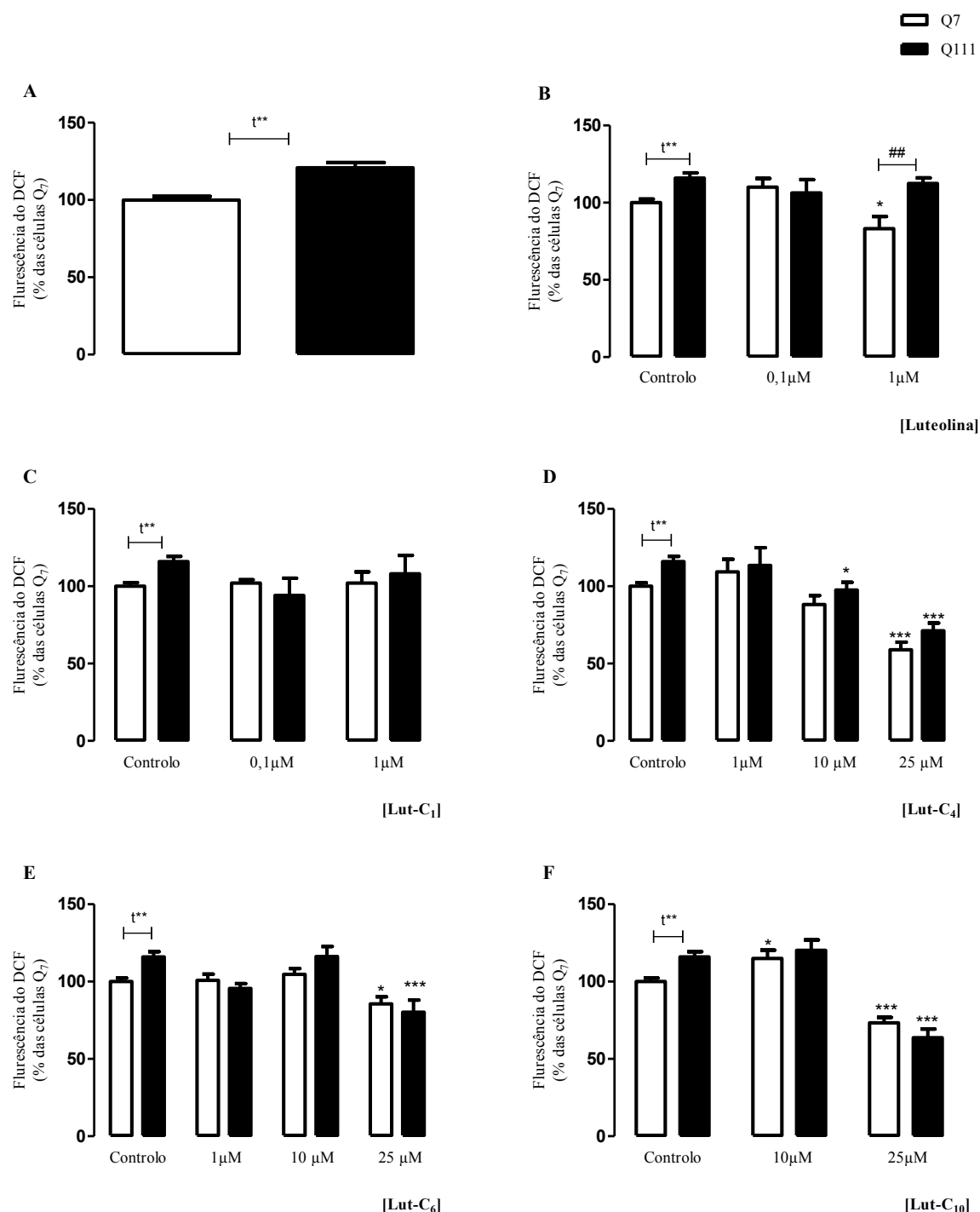
### **3.3 Efeito da luteolina e dos seus derivados 3-alkilo nos níveis de peróxidos intracelulares**

De modo a avaliar o efeito antioxidante dos derivados de 3-alkil-luteolina nas linhas celulares Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub>, procedeu-se à quantificação de peróxidos intracelulares, usando o método fluorimétrico que avalia a oxidação da sonda DCFH<sub>2</sub> a DCF. Tendo em conta os resultados obtidos pelo método do MTT e pela avaliação da libertação de LDH, apenas foram testadas as concentrações 0,1 e 1 µM do composto natural (luteolina) e do composto de cadeia curta (Lut-C<sub>1</sub>), as concentrações intermédias (1, 10 e 25 µM) do Lut-C<sub>4</sub> e Lut-C<sub>6</sub> e as concentrações 10 e 25 µM do Lut-C<sub>10</sub>.

Tal como se pode observar na figura 19, em condições basais, as células Q<sub>111</sub> produziram maior quantidade de peróxidos intracelulares relativamente às células Q<sub>7</sub> (115,9±3,4% nas células Q<sub>111</sub> e 100,0±2,3% nas células Q<sub>7</sub>) (Figura 19A). Com exceção das células WT tratadas com luteolina a 1 µM, que produziram menor quantidade de peróxidos intracelulares (83,2±7,82%), as restantes condições de tratamento com este composto não induziram alterações significativas na produção de peróxidos intracelulares nas duas linhas celulares (Figura 19B). De todos os derivados da luteolina apenas o composto Lut-C<sub>1</sub> (nas concentrações testadas) não mostrou qualquer alteração na produção de peróxidos intracelulares relativamente ao basal, em qualquer das linhas celulares (Figura 19C). Relativamente aos restantes compostos (Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub>), observou-se que a concentração de 25 µM causou uma diminuição significativa da produção de peróxidos intracelulares nas células Q<sub>7</sub> (58,9±5,0; 85,5±4,7 e 73,3±3,5% para o Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub>, respetivamente) e Q<sub>111</sub> (71,1±5,1; 80,1±8,0 e 63,7±5,6% para o Lut-C<sub>4</sub>,



Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub>, respetivamente) (Figura 19D-F). O Lut-C<sub>4</sub> 10  $\mu$ M reduziu também a produção de peróxidos intracelulares nas células mutantes ( $97,5 \pm 5,0\%$ ) (Figura 19D).



**Figura 19 – Quantificação da fluorescência do DCF nas linhas celulares estriatais *STHdh*<sup>7/7</sup> (Q<sub>7</sub> - células do tipo selvagem) e *STHdh*<sup>111/111</sup> (Q<sub>111</sub> - células mutantes).** As linhas celulares foram incubadas sem tratamento (A), 0,1 e 1  $\mu$ M de luteolina (B) e Lut-C<sub>1</sub> (C); 1, 10 e 25  $\mu$ M de Lut-C<sub>4</sub> (D), Lut-C<sub>6</sub> (E), 10 e 25  $\mu$ M de Lut-C<sub>10</sub> (F) durante 24 horas a 33°C, e os resultados foram expressos em percentagem das células

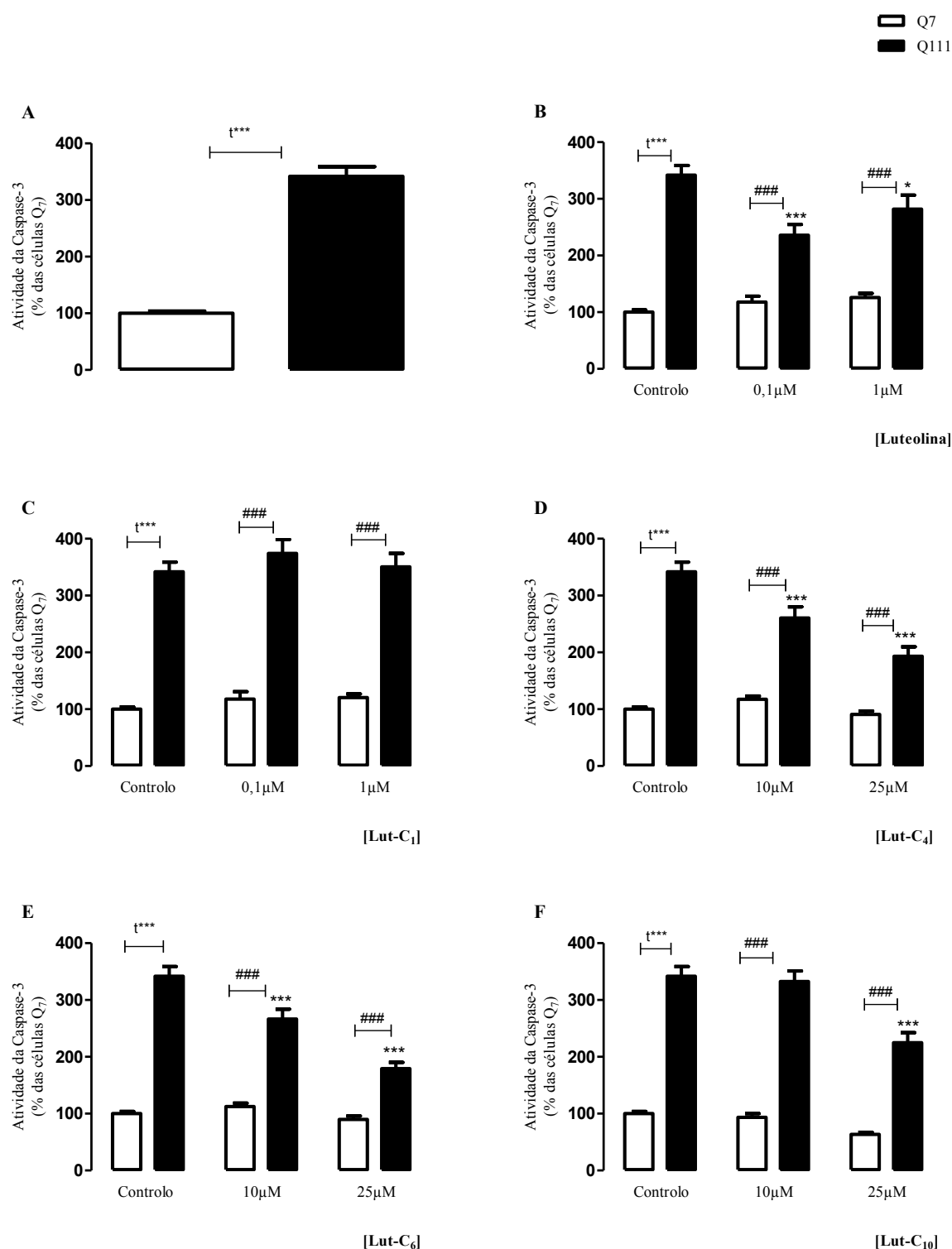
Q<sub>7</sub> (controlo). Os resultados representam a média  $\pm$  SEM de 4 experiências independentes realizadas em quadruplicado. Análise estatística: \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  relativamente às células Q<sub>7</sub> (controlo); ## $p < 0,01$  quando comparadas as células Q<sub>111</sub> e Q<sub>7</sub> para a mesma condição experimental e t\*\* $p < 0,01$  células controlo-Q<sub>111</sub> *versus* células controlo-Q<sub>7</sub>.

Em suma, após tratamento com os derivados 3-alkil-luteolina, Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub> a 25  $\mu$ M, as células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub> apresentaram uma menor produção de peróxidos intracelulares, comparativamente às células não-tratadas.

### **3.4 Efeito da luteolina e dos seus derivados 3-alkilo na avaliação da atividade da caspase-3**

A influência dos derivados da luteolina nos mecanismos de morte celular foi avaliada através da atividade da caspase-3, uma proteína chave nos processos de morte celular por apoptose. Tal como descrito para a avaliação de peróxidos intracelulares, as concentrações de cada um dos derivados da luteolina contendo cadeias 3-alkilo, foram selecionadas tendo em conta a capacidade redutora dos compostos (principalmente pelo teste do MTT), nas duas linhas celulares em estudo.

Em condições basais, observou-se um aumento significativo da atividade da caspase-3 na linha Q<sub>111</sub> em relação às células Q<sub>7</sub> (100,2 $\pm$ 3,5 e 341,7 $\pm$ 17,3% nas células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub>, respetivamente) (Figura 20A). Nas células Q<sub>7</sub>, não se observaram efeitos significativos da luteolina ou dos derivados (Lut-C<sub>1</sub>, Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub>) na atividade da caspase-3 relativamente às células controlo, não tratadas (Figura 20B-F). Verificou-se ainda que, nas concentrações testadas, o Lut-C<sub>1</sub> não afetou a atividade da caspase-3 nas células Q<sub>111</sub> (Figura 20C). Porém, observou-se uma diminuição significativa da atividade da caspase-3 nas células mutantes após tratamento com 0,1 e 1  $\mu$ M de luteolina (Figura 20B). Relativamente ao Lut-C<sub>4</sub> e ao Lut-C<sub>6</sub> verificou-se um efeito dependente da concentração na redução da atividade da caspase-3 nas células Q<sub>111</sub> (Figura 20D e E). Esta tendência também se verificou nas células mutantes após tratamento com o Lut-C<sub>10</sub>, embora a diminuição da atividade da caspase-3 só tenha sido observada na presença de 25  $\mu$ M deste composto (Figura 20F).



**Figura 20 – Atividade da caspase-3 nas linhas celulares *STHdh*<sup>7/7</sup> (Q<sub>7</sub> - células do tipo selvagem) e *STHdh*<sup>11/11</sup> (Q<sub>111</sub> - células mutantes).** As linhas celulares foram incubadas sem tratamento (A), 0,1 e 1 μM de luteolina (B) e Lut-C<sub>1</sub> (C); 10 e 25 μM de Lut-C<sub>4</sub> (D), Lut-C<sub>6</sub> (E) e Lut-C<sub>10</sub> (F) durante 24 horas a 33°C, e os resultados foram expressos em percentagem das células Q<sub>7</sub> (controlo). Os resultados representam a média ± SEM de 6 experiências independentes realizadas em quadruplicado. Análise estatística: \**p*<0,05 e \*\*\**p*<0,001

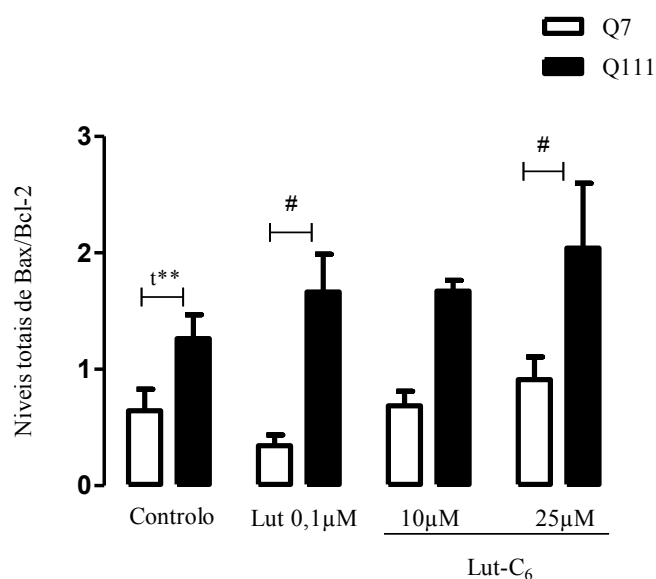
relativamente às células Q<sub>7</sub> (controlo); ### $p < 0,001$  quando comparadas as células Q<sub>111</sub> e Q<sub>7</sub> para a mesma condição experimental e  $t^{***}p < 0,001$  células controlo-Q<sub>111</sub> *versus* células controlo-Q<sub>7</sub>.

Em síntese, a figura 20 mostra que os derivados Lut-C<sub>4</sub> e Lut-C<sub>6</sub> (10 e 25  $\mu$ M) reduziram de forma mais significativa a atividade da caspase-3 observada nas células Q<sub>111</sub>.

### **3.5 Efeito da luteolina e dos seus derivados nas proteínas apoptóticas**

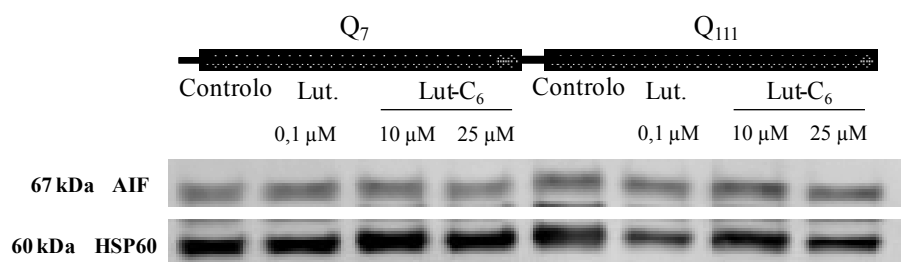
De forma a avaliar o efeito dos derivados 3-alkyl-luteolina nas linhas celulares Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub> no mecanismo de apoptose procedeu-se à quantificação de proteínas anti- e pró-apoptóticas. Considerando os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade e na atividade da caspase-3, foram selecionadas três condições para a determinação do rácio Bax/Bcl-2 (extratos totais celulares) e da proteína AIF (extratos mitocondriais) nas células estriatais Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub>: luteolina (0,1  $\mu$ M) e Lut-C<sub>6</sub> (10 e 25  $\mu$ M).

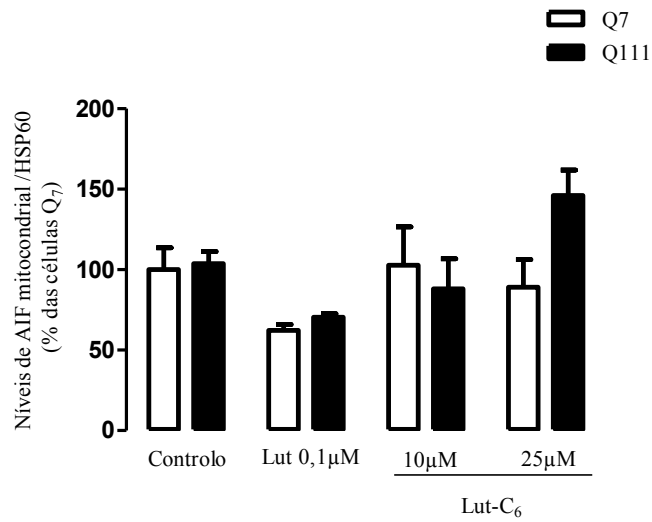
Em condições basais, as células Q<sub>111</sub> mostraram um aumento do rácio Bax/Bcl-2 ( $1,3 \pm 0,2$ ), comparativamente às células Q<sub>7</sub> ( $0,6 \pm 0,2$ ) (Figura 21), de acordo com uma maior atividade da caspase-3 nestas condições experimentais. Contudo, nenhum dos compostos (luteolina e Lut-C<sub>6</sub>) reduziu significativamente o rácio Bax/Bcl-2. Efetivamente, das condições experimentais testadas, apenas se verificou um decréscimo do rácio Bax/Bcl-2 nas células Q<sub>7</sub> tratadas com luteolina (0,1  $\mu$ M) ( $0,34 \pm 0,1$ ).



**Figura 21 – Efeito da luteolina e do derivado da luteolina, Lut-C<sub>6</sub> no rácio Bax/Bcl-2 nas linhas celulares estriatais *STHdh*<sup>7/7</sup> (Q<sub>7</sub> - células do tipo selvagem) e *STHdh*<sup>111/111</sup> (Q<sub>111</sub> - células mutantes).** As linhas celulares foram tratadas com 0,1 µM de luteolina, e 10 e 25 µM de Lut-C<sub>6</sub>, durante 24 horas a 33°C. Os resultados representam a média ± SEM de 6 experiências independentes realizadas em triplicado. Análise estatística: #*p*<0,05 quando comparadas as células Q<sub>111</sub> e Q<sub>7</sub> para a mesma condição experimental e *t*\*\**p*<0,01 células Q<sub>111</sub> *versus* células controlo-Q<sub>7</sub>.

Relativamente aos níveis mitocondriais da proteína AIF, verificou-se que a luteolina (0,1 µM) induziu uma diminuição da proteína AIF na mitocôndria nas duas linhas celulares (62,3±3,6 e 70,4±2,2% nas células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub>, respetivamente) (Figura 22). Relativamente às células mutantes, observou-se um aumento após tratamento com 25 µM Lut-C<sub>6</sub>, embora sem significância (146,1±15,9 %) (Figura 22), sugerindo uma maior retenção mitocondrial desta proteína pró-apoptótica, independentemente da atividade de caspases.





**Figura 22 – Efeito da luteolina e do derivado da luteolina Lut-C<sub>6</sub> nos níveis mitocondriais da proteína AIF nas linhas celulares estriatais *STHdh*<sup>7/7</sup> (Q<sub>7</sub> - células do tipo selvagem) e *STHdh*<sup>111/111</sup> (Q<sub>111</sub> - células mutantes).** As linhas celulares foram tratadas com 0,1 μM de luteolina, e 10 e 25 μM de Lut-C<sub>6</sub>, durante 24 horas a 33°C, e os resultados foram expressos em percentagem das células Q<sub>7</sub> (controlo). Os resultados representam a média ± SEM de 3 experiências independentes realizadas em triplicado.

# Capítulo IV

---

Discussão





## 4. Discussão

A ativação de determinadas vias apoptóticas e a produção de ROS parecem contribuir para a neurodegenerescência progressiva observada no estriado e no córtex dos doentes de Huntington [1, 14, 128-130]. Neste contexto, os compostos fenólicos antioxidantes, tais como a flavona luteolina, são potenciais agentes de proteção desta doença neurodegenerativa. De facto, para além da sua elevada capacidade antioxidante, esta flavona está descrita como modeladora da função neuronal e supressora de moléculas apoptóticas. Para além disso, no contexto deste trabalho, é importante referir que a capacidade antioxidante dos derivados 3-alkil-luteolina testados em células estriatais que expressam huntingtina mutante foram previamente investigados, em linhas celulares e eritrócitos. Esses estudos permitiram concluir que estas flavonas são inibidores eficazes das espécies reativas  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  e  $HOCl$ , atuando como “scavengers” de radicais e exibem capacidade protetora em modelos de lesão oxidativa, embora a proteção exercida seja dependente da natureza do modelo biológico [103]. Desta forma, os resultados presentes na literatura permitem sugerir que a luteolina, bem como os seus derivados, Lut-C<sub>1</sub>, Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub>, possuem propriedades antioxidantes que são importantes na proteção de doenças neurodegenerativas, nomeadamente na DH [118, 126].

Como principais resultados deste trabalho, deve salientar-se que, quer a luteolina, quer os compostos sintéticos em estudo induziram um aumento significativo da capacidade redutora das células, quando medido pelos métodos amplamente referenciados na literatura para este efeito (MTT e Alamar *blue*). Embora os resultados obtidos por estes dois métodos sejam distintos, em conjunto permitiram concluir que o tratamento das células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub> com estas flavonas na concentração de 50  $\mu$ M causa citotoxicidade. Verificou-se, ainda, que o tratamento das células com estas flavonas, em concentrações que não alteram a capacidade redutora do MTT, também não alterou a sua integridade membranar. Em algumas condições, os derivados 3-alkil-luteolina induziram uma diminuição da produção de peróxidos intracelulares nas células *wild type* e nas células mutantes, bem como na atividade da caspase-3 nas células mutantes. Todavia, a diminuição da atividade da caspase-3 nas células mutantes não parece ser modulada pela alteração celular do rácio Bax/Bcl-2, uma vez que nessas condições (na presença de luteolina e do derivado Lut-C<sub>6</sub>) não se verificou uma diminuição deste rácio.

#### 4.1 *STHdh*<sup>7/7</sup> e *STHdh*<sup>111/111</sup> em condições basais

De acordo com os resultados anteriormente obtidos pelo nosso grupo de investigação, em condições basais, as células Q<sub>111</sub> não apresentaram alterações significativas da viabilidade celular, relativamente às células Q<sub>7</sub> (pelo método do MTT). Resultados anteriores não mostraram alterações entre estas duas linhas celulares quando avaliada a viabilidade celular com os marcadores fluorescentes *Hoechst* e iodeto de propídeo, PI (marcadores específicos para avaliação da apoptose e necrose celular, respetivamente) [130]. Ainda, o resultado descrito nesse trabalho para a marcação com PI está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo para a libertação de LDH, uma vez que não foram verificadas diferenças significativas na libertação desta enzima para o meio extracelular.

A semelhança de viabilidade celular das células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub> foi também sugerida por Chafekar *et al.*, (2012), após utilização dos ensaios de MTT e de fluorescência da luciferase [131]. O mesmo resultado foi descrito por Xifró *et al.*, (2008), quando avaliada a morfologia nuclear nas células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub>, em condições basais, usando o marcador fluorescente *Hoechst* [132]. Num outro modelo de Huntington, os cíbridos DH, Ferreira *et al.*, (2010) verificaram que não havia alteração na libertação de LDH em cíbridos DH, comparativamente às células controlo [129].

Relativamente à produção de ROS, as células que expressam Htt mutante apresentaram níveis mais elevados de peróxidos intracelulares comparativamente às células *wild type*. Contudo, a diferença dos níveis intracelulares de peróxidos entre as duas linhas celulares foi significativamente menor do que a anteriormente observada em estudos realizados no mesmo grupo de investigação (Ribeiro e co-autores, resultados não publicados). É possível que a disparidade destes resultados se deva à diferente metodologia aplicada na preparação do extrato celular (para quantificação da respetiva proteína). Deve salientar-se que os níveis mais elevados de peróxidos intracelulares nas células mutantes, em relação ao das células *wild type*, estão provavelmente associados a alterações mitocondriais, uma vez que este organelo desempenha uma função central na produção e regulação dos níveis de ROS a nível celular [31]. De acordo com estas observações, Milakovic *et al.*, (2008) avaliaram a disfunção mitocondrial nas células Q<sub>111</sub> e Q<sub>7</sub> e

verificaram que a expressão de Htt mutante compromete a capacidade da mitocôndria para produzir ATP [84].

Os níveis superiores de ROS em células que expressam Htt mutante foram ainda verificados noutros modelos de DH, sugerindo que a expressão de Htt mutante e o aumento de ROS estão fortemente associados. Em cíbridos, Ferreira *et al.*, (2010) verificaram um aumento significativo de ROS (aproximadamente 26%) em células DH comparativamente com as células controlo [129]. Ainda, em murganhos transgénicos R6/2, que expressam o exão 1 da Htt mutante humana, observou-se também uma maior formação de ROS, comparativamente aos murganhos controlo [25].

Em vários modelos celulares de DH foi também verificado um aumento da atividade das caspases [133, 134]. Deve salientar-se que, de acordo com a literatura, as caspases são responsáveis pela clivagem da Htt *full-length*, conduzindo à formação de fragmentos da proteína Htt, uma condição que promove a disfunção neuronal e a neurodegeneração característica da DH [71, 72]. Em condições basais verificou-se uma atividade mais elevada da caspase-3 nas células que expressam a Htt mutante, comparativamente às *wild type*, de acordo com os resultados anteriormente descritos por Rosenstock *et al.*, (2011) [130] e por Chafekar *et al.*, (2012) [135].

No entanto, apesar dos resultados obtidos na avaliação da atividade da caspase-3 terem sido os esperados, quando se procedeu à quantificação dos níveis mitocondriais e totais de proteínas apoptóticas (proteína AIF e rácio Bax/Bcl-2) verificaram-se resultados não concordantes com trabalhos anteriormente realizados no mesmo grupo de investigação. Em condições basais, observou-se um rácio Bax/Bcl-2 superior nas células que expressam a Htt mutante relativamente às células WT, enquanto Rosenstock *et al.*, (2011) não encontraram diferenças nos níveis de Bax/Bcl-2 entre as duas linhas celulares [130]. Uma discrepância de resultados foi também observada na avaliação da proteína mitocondrial AIF, que induz o processo apoptótico através de uma via independente das caspases [136]. Em oposição aos resultados obtidos no presente trabalho, Rosenstock *et al.*, (2011) mostraram que as células Q<sub>111</sub> tinham níveis inferiores de AIF a nível mitocondrial, comparativamente ao das células Q<sub>7</sub> [130].

## 4.2 Efeitos da luteolina e dos derivados 3-alkyl-luteolina nas células *STHdh*<sup>7/7</sup> e *STHdh*<sup>111/111</sup>

Em relação aos resultados obtidos na análise da capacidade redutora das células *wild type* e mutantes, deve referir-se que ambos os métodos usados (MTT e Alamar *blue*), têm por base a atividade das desidrogenases, e desta forma, a disparidade de resultados obtidos neste estudo após tratamento com diferentes concentrações de flavonas, torna-se difícil de explicar. No entanto, uma vez que na literatura o método do MTT é amplamente apresentado para a avaliação da capacidade redutora/citotoxicidade de compostos fenólicos, os resultados obtidos por este método foram tomados em maior consideração, em relação aos do teste Alamar *blue*.

Em geral, as células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub>, quando tratadas com a luteolina e com o derivado da luteolina de cadeia curta (Lut-C<sub>1</sub>), em concentrações baixas (0,1 e 1 µM) não apresentaram alterações significativas da capacidade redutora de MTT. No entanto, quando expostas a concentrações de 10, 25 e 50 µM, as células mostraram menor poder redutor, sugerindo que nestas concentrações estes compostos são citotóxicos. Que seja do nosso conhecimento, destes dois compostos, apenas a luteolina foi testada em células neuronais. Zhao *et al.*, (2012) verificaram recentemente que o tratamento de neurónios corticais com luteolina (5, 10 e 20 µM) não afetou a capacidade redutora de MTT [126]. Um efeito semelhante foi observado por Silva *et al.*, (2008) para concentrações de luteolina de 50 µM, em células PC12 (linha celular catecolaminérgica) [127]. Ainda, em dois modelos de citotoxicidade induzida pelos peróxidos BuOOH (do inglês, “tert-Butylhydroperoxide”) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células PC12, a luteolina (6, 12 e 25 µM) apresentou capacidade citoprotetora quando avaliada pelo método de MTT [137]. Assim, a comparação dos resultados obtidos no presente trabalho para o tratamento com a flavona luteolina com os dados previamente descritos na literatura, permitem sugerir que as células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub> são mais suscetíveis a esta flavona do que outras células neuronais onde este composto foi testado. Por outro lado, os resultados obtidos neste trabalho para os testes efetuados com os restantes derivados da luteolina (Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub>) permitem ainda sugerir que a introdução de uma cadeia alquílica com 4, 6 e 10 carbonos na posição 3 da luteolina, diminui a sua citotoxicidade nas células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub>. De facto, quando tratadas com Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-

C<sub>10</sub> nas concentrações de 10 e 25 µM, as células Q<sub>7</sub> e/ou Q<sub>111</sub> aumentaram a sua capacidade redutora, avaliada pelo método de MTT (figuras 15A, 16 A e 17A).

Uma vez que os resultados obtidos pelos métodos de MTT e Alamar *blue* (capacidade redutora) foram distintos, e de forma a obter resultados mais consistentes para o trabalho, foi ainda avaliada a integridade membrana através da quantificação da libertação da LDH nas condições que não induziram redução da capacidade redutora do MTT. Os resultados obtidos por este método mostraram que para essas condições, a luteolina e as flavonas sintéticas não induziram aumento na libertação da LDH, sugerindo que a integridade membrana nas células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub> foi preservada na presença destes compostos. A preservação da integridade membrana por exposição à luteolina (ou à apigenina) até concentrações de 25 µM foi também anteriormente demonstrada por Rezai *et al.*, (2008), quando avaliaram o efeito destes flavonoides numa cultura primária de células da microglia exposta a IFN-γ [138]. Ainda, Zhao *et al.*, (2012) descreveram um aumento da integridade membrana numa cultura primária de neurónios corticais tratadas com luteolina ou com os seus derivados 5-isobutiril-luteolina, 5-acetil-luteolina, 7-propionil-luteolina, 5-octil-luteolina e 7,3',4'-tri-benzil-luteolina [126]. Estes resultados são concordantes com os resultados descritos por Saija *et al.*, (1995); estes autores sugerem que alguns flavonoides modulam a fluidez da membrana em lipossomas [139]. De facto, alguns estudos indicam que a dupla ligação na posição 2-3 e/ou a presença do grupo 3-OH na estrutura de alguns flavonoides confere maior rigidez ao anel C, mantendo-o numa posição mais coplanar em relação ao anel A e favorecendo a interação destes compostos com as membranas celulares [139-141].

Das condições testadas neste trabalho, apenas o Lut-C<sub>6</sub> (10 µM) mostrou um efeito significativamente protetor relativamente à integridade membrana das células Q<sub>7</sub>, embora tenha sido observada uma tendência protetora quando avaliada a integridade membrana em células tratadas com Lut-C<sub>1</sub> (1 µM) e Lut-C<sub>4</sub> (10 µM) (figura 18C-D).

Em relação à avaliação da produção de peróxidos intracelulares nas células *wild type* e mutantes após tratamento com concentrações não tóxicas (resultante da análise pelo teste do MTT) do composto luteolina, os resultados indicaram que esta flavona não induziu qualquer alteração nos níveis de ROS, o que sugere que não previne a formação destas

espécies reativas, em células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub>. De notar que a diminuição da produção de ROS pela luteolina foi previamente demonstrada em astrócitos de rato, num modelo de stresse oxidativo induzido por CHP (do inglês “Cumene hydroperoxide”) [142]. Por outro lado, a presença das cadeias 3-alkilo permite obtenção de compostos com menor citotoxicidade para as células Q<sub>7</sub>/Q<sub>111</sub> (segundo o método MTT) e maior atividade antioxidante (segundo a análise de produção de ROS). Após tratamento com Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-<sub>10</sub> (25 µM), tanto as células Q<sub>7</sub> como as células que expressam Htt mutante mostraram valores de ROS significativamente diminuídos. Verificou-se ainda que o composto Lut-C<sub>4</sub> (25 µM) induziu uma diminuição significativa dos níveis de ROS nas células Q<sub>111</sub> e uma ligeira diminuição nas células Q<sub>7</sub>, sugerindo que destes três derivados de luteolina, o Lut-C<sub>4</sub> é o mais eficaz na neutralização de ROS intracelulares. Em geral, a capacidade dos derivados Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub>, em reduzir os níveis intracelulares de ROS está de acordo com os resultados obtidos em modelos químicos e biológicos, onde estes demonstraram ser bons captadores de ROS. Filipe *et al.*, (2009) testaram as 3-alkil-3',4',5,7-tetrahidroxiflavonas com 1, 4, 6 e 10 carbonos, em eritrócitos de indivíduos saudáveis e em queratinócitos extraídos da pele humana e verificaram que a atividade antioxidante destes compostos é potenciada pela introdução da cadeia alquílica. No estudo acima referido, os autores analisaram o efeito dos análogos da luteolina na hemólise dos eritrócitos causada pelo um agente oxidante *t*-BuOOH, um indicador indireto da oxidação lipídica, e pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tendo concluído que o Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e o Lut-C<sub>10</sub> inibem significativamente a hemólise dos eritrócitos e queratinócitos quando expostos ao *t*-BuOOH [103]. Ainda neste contexto, Saija *et al.*, (1995) sugeriram que a inibição da peroxidação lipídica induzida pelos radicais livres está relacionada não apenas com as características estruturais dos flavonoides mas também com a capacidade de interagirem e se introduzirem na bicamada lipídica [139].

Quando tratadas com Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub> (10 e 25 µM), as células Q<sub>111</sub> mostraram uma diminuição da atividade da caspase-3. Após tratamento com a luteolina (0,1 e 1 µM), a atividade da caspase-3 também diminuiu significativamente nas células Q<sub>111</sub>, sugerindo assim que esta flavona possui uma maior capacidade de inibição da atividade da caspase-3 comparativamente aos seus derivados. A atividade protetora da luteolina (1 e 10 µM) quando avaliada a atividade da caspase-3 foi anteriormente verificada por Cheng *et al.*, (2010) numa cultura primária de córtex de neurónios de rato

após indução da neurotoxicidade pela proteína  $\beta$ -amilóide [143]. A proteção pela luteolina (e também por apigenina e crisina) foi igualmente verificada num estudo realizado por Kang *et al.*, (2004), em células de neuroblastoma SH-SY5Y expostas ao  $H_2O_2$  [125]. Por outro lado, e de acordo com o nosso conhecimento da literatura nesta área, não existem dados descritos na literatura sobre o efeito de derivados de luteolina na atividade da caspase-3 em células neuronais. Considerando os resultados de Saija, *et al* (1995), que demonstraram que substituintes na posição -3 da luteolina conferem uma conformação molecular que pode conferir rigidez à membrana mitocondrial [139], é possível sugerir que a diminuição simultânea de ROS e da atividade da caspase-3 causada pelos tratamentos de Lut-C<sub>4</sub>, Lut-C<sub>6</sub> e Lut-C<sub>10</sub> (figuras 19 e 20), possa em parte ser explicada através da interação com este organelo. De facto, para além de ser uma fonte de radicais livres, a mitocôndria desempenha um papel fundamental nas vias intrínseca e extrínseca do processo apoptótico, uma vez que uma variedade de estímulos apoptóticos pode modificar a permeabilidade mitocondrial, induzindo a libertação de proteínas pró-apoptóticas normalmente localizadas no espaço intermembranar das mitocôndrias (por exemplo, o citocromo c).

No que se refere à avaliação das proteínas apoptóticas efetuada neste trabalho, nenhum dos compostos (luteolina e Lut-C<sub>6</sub>) reduziu significativamente o rácio Bax/Bcl-2. Efetivamente, das condições experimentais testadas, apenas se verificou um decréscimo do rácio Bax/Bcl-2 nas células Q<sub>7</sub> tratadas com luteolina (0,1  $\mu$ M) e, desta forma, os resultados sugerem que a diminuição da atividade da caspase-3 induzida pela luteolina e pelo Lut-C<sub>6</sub> nas células Q<sub>111</sub> (figura 20B e E) não está associada à alteração do rácio Bax/Bcl-2. Até ao momento, não há evidências de estudos que tenham avaliado o efeito da luteolina e de derivados da luteolina nos níveis das proteínas Bax e Bcl-2, em células neuronais. Na literatura apenas se encontram descritas reduções da atividade da caspase-3 e do rácio Bax/Bcl-2 em células PC12, quando sujeitas a stresse oxidativo induzido por uma dose elevada de glucose, após tratamento com a quercetina (um flavonol estruturalmente semelhante à flavona luteolina) [144]. No entanto, dada a importância que a função 3-OH dos flavonoides tem na determinação da sua atividade celular, os resultados obtidos com a quercetina não devem ser transpostos para a luteolina.

O tratamento com a luteolina (0,1  $\mu$ M) induziu uma diminuição dos níveis mitocondriais da proteína AIF (figura 22) nas duas linhas celulares, sugerindo uma maior libertação desta proteína para o citosol. Relativamente às células mutantes, observou-se um aumento dos níveis mitocondriais de AIF após tratamento com 25  $\mu$ M Lut-C<sub>6</sub>, sugerindo uma maior retenção mitocondrial desta proteína pró-apoptótica, cuja ação é independente da atividade de caspases. De forma semelhante ao que se verifica para os efeitos da luteolina nos níveis de Bax e Bcl-2, não existem até ao momento nenhuns dados bibliográficos sobre a ação da luteolina nos níveis de AIF mitocondrial, em células neuronais. Embora, Bournival *et al.*, (2009) tenham verificado uma diminuição da translocação de AIF para o núcleo em células PC12 expostas a quercetina [145]; a disparidade entre as estruturas desses compostos fenólicos não permite uma comparação dos resultados obtidos nestes dois trabalhos.

### **4.3 Principais dificuldades e propostas para trabalho futuro**

Como referido anteriormente, a disparidade dos resultados obtidos na avaliação da toxicidade das células quando expostas à luteolina e aos derivados 3-alkyl-luteolina, pelos métodos do MTT e Alamar *blue* permite-nos concluir que estes dois métodos de citotoxicidade apresentam limiares de sensibilidade distintos relativamente aos compostos fenólicos em estudo. Quando avaliada a libertação de LDH nas condições experimentais que não induziram diminuição da redução do MTT, não foi verificada qualquer alteração na integridade membranar das células Q<sub>7</sub> e Q<sub>111</sub>. Embora os métodos MTT e LDH sejam distintos, a análise dos dois métodos é essencial: o teste do MTT tem sido associado à atividade metabólica mitocondrial (relacionada com a atividade de desidrogenases que participam em vias metabólicas mitocondriais), enquanto a libertação de LDH dá informação sobre a integridade da membrana plasmática. De qualquer forma, mesmo tendo em consideração que o teste de MTT é o mais utilizado em estudos de avaliação do efeito de compostos fenólicos na viabilidade celular de neurónios, os resultados obtidos por este método deverão ser confirmados por métodos mais específicos, como a marcação com marcadores fluorescentes que interagem com o DNA, tais como por exemplo o *Hoeschst* e/ou o iodeto de propídeo, possibilitando a análise do número de células apoptóticas e necróticas, respetivamente.



Durante a realização do trabalho experimental conducente a esta dissertação, e apesar de várias tentativas, não se obteve marcação de algumas proteínas mitocondriais e citosólicas, nomeadamente, o citocromo c, SMAC/DIABLO e Puma (resultados não apresentados), não possibilitando assim obter resultados sobre os efeitos dos compostos fenólicos em estudo, nos níveis dessas proteínas.

Assim, no geral, o estudo dos efeitos das flavonas (luteolina e 3-alkil-luteolina) nas proteínas envolvidas em processos de apoptose encontra-se incompleto e, por essa razão, deverá ser mais investigado em estudos futuros. Assim, dever-se-ia proceder à avaliação dos efeitos dos compostos nos níveis de outras proteínas mitocondriais e citosólicas que desencadeiam um processo apoptótico. Além disso, poderá ainda ser avaliado o rácio ATP/ADP e a atividade da aconitase que é um indicador indireto da produção mitocondrial de ROS, bem como a atividade de antioxidantes endógenos, como o rácio GSH/GSSG, a atividade de enzimas do ciclo da glutathione (por exemplo a GPx e a GR), e ainda a atividade das enzimas superóxido dismutase.

Um outro parâmetro a ter em consideração na avaliação da luteolina e dos derivados 3-alkil-luteolina é o modelo animal utilizado. Como referido anteriormente, o efeito da luteolina e dos derivados 3-alkil-luteolina foram avaliados numa linha celular neuronal, *STHdh*, obtida do estriado de murganhos *knock-in* homozigóticos que expressam a mutação da huntingtina com 111 glutaminas (*STHdh*<sup>111/111</sup> ou Q<sub>111</sub>) e em células normais que expressam a huntingtina *wild type* com 7 glutaminas (*STHdh*<sup>7/7</sup> ou Q<sub>7</sub>) derivada de murganhos controlo. Este modelo celular representa as fases iniciais da DH, tendo em conta que não apresenta evidências de agregados proteicos visíveis, formados pela Htt mutante, ou de morte celular por necrose [28]. Assim, estas células têm sido utilizadas em estudos que envolvam a avaliação da disfunção mitocondrial e metabólica associada à DH [130, 132, 146], justificando a sua utilização no presente trabalho. Além disso, é um modelo vantajoso na medida em que pode ser utilizado em estudos que necessitam de um longo período de experimentação, uma vez que são células aderentes que facilmente são expandidas e disponíveis para investigação. No entanto, em estudos que envolvam a avaliação do efeito de compostos fenólicos é importante utilizar mais do que um modelo celular, uma vez que a biodisponibilidade dos compostos e a suscetibilidade celular poderão ser diferentes. De facto, tem-se verificado que a suscetibilidade de modelos

celulares da DH é dependente do número de glutaminas na proteína Htt, dos seus fragmentos e/ou se são células pós-mitóticas ou proliferativas.

# Capítulo V

---

Conclusão



## 5.1 Conclusão

Em conclusão, a identificação de alterações a nível do mecanismo do stresse oxidativo e apoptótico nas células *wild type* e nas células que expressam Htt mutante *full-length* quando tratadas com os compostos testados, em particular com a luteolina (0,1  $\mu\text{M}$ ) e o Lut-C<sub>6</sub> (25  $\mu\text{M}$ ) poderão permitir esclarecer os mecanismos de proteção destes compostos, em modelos de DH. A manutenção da integridade membranar, associada à diminuição da atividade da caspase-3, sugere que estes compostos (luteolina e Lut-C<sub>6</sub>) intervêm na inativação da via apoptótica associada à ativação da caspase-3. Por outro lado, a diminuição dos níveis de peróxidos intracelulares sugere que estes compostos interferem com a produção e/ou remoção das ROS, assim como os efeitos lesivos induzidos pelas ROS a nível celular.

Apesar das evidências sugeridas na secção anterior, o mecanismo de atuação dos derivados 3-alkyl-luteolina, assim como a sua biodisponibilidade ainda é não conhecida, pelo que este estudo deverá ser aprofundado no futuro através da utilização de outros métodos de avaliação, assim como a análise numa cultura celular primária de neurónios e em modelos animais da DH.



# Capítulo VI

---

Bibliografía





## 6. Bibliografia

1. Roos, R.A., Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J Rare Dis*, 2010. **5**(1): p. 40.
2. Oliveira, J.M., S. Chen, S. Almeida, R. Riley, J. Goncalves, C.R. Oliveira, M.R. Hayden, D.G. Nicholls, L.M. Ellerby, and A.C. Rego, Mitochondrial-dependent Ca<sup>2+</sup> handling in Huntington's disease striatal cells: effect of histone deacetylase inhibitors. *J Neurosci*, 2006. **26**(43): p. 11174-86.
3. Reddy, P.H., P. Mao, and M. Manczak, Mitochondrial structural and functional dynamics in Huntington's disease. *Brain Res Rev*, 2009. **61**(1): p. 33-48.
4. Anónimo. Associação Portuguesa de doentes de Huntington (APDH). 30 de Dezembro de 2011]; Available from: <http://www.huntington-portugal.com/>.
5. Roze, E., E. Cahill, E. Martin, C. Bonnet, P. Vanhoutte, S. Betuing, and J. Caboche, Huntington's Disease and Striatal Signaling. *Front Neuroanat*, 2011. **5**: p. 55.
6. Lesk, A.M., Introduction to protein science. Architecture, Function and Genomics 2004, Great Britain: Oxford University Press.
7. Sari, Y., Huntington's Disease: From Mutant Huntingtin Protein to Neurotrophic Factor Therapy. *Int J Biomed Sci*, 2011. **7**(2): p. 89-100.
8. Dijk, J.G.v., E.A.v.d. Velde, R.A.C. Roos, and G.W. Bruyn, Juvenile Huntington disease. *Hum Genet* 1986. **73**: p. 235-239.
9. Vonsattel JP, M.R., Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson and EPJr., Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1985. **44**: p. 559-577.
10. Kanazawa, I., Therapeutic Strategies in Huntington's Disease. *Journal of Clinical Neurology* 2006. **2**(4): p. 213-224.
11. Ersoy, N., Molecular genetics of Huntington's Disease: When size does matter. *J Cell Molec Biol*, 2007. **6**: p. 1-8.
12. Andre, V.M., C. Cepeda, and M.S. Levine, Dopamine and glutamate in Huntington's disease: A balancing act. *CNS Neurosci Ther*, 2010. **16**(3): p. 163-78.
13. Herndon, E.S., C.L. Hladik, P. Shang, D.K. Burns, J. Raisanen, and C.L. White, 3rd, Neuroanatomic profile of polyglutamine immunoreactivity in Huntington disease brains. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2009. **68**(3): p. 250-61.
14. Rego, A.C.O., Catarina R., Mitochondrial Dysfunction and Reactive Oxygen Species in Excitotoxicity and Apoptosis: Implications for the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Neurochemical Research*, 2003. **28**(10): p. 1563-1574.
15. Maat-Kievit, A., P. Helderma-van den Enden, M. Losekoot, P. de Knijff, R. Belfroid, M. Vegter-van der Vlis, R. Roos, and M. Breuning, Using a roster and haplotyping is useful in risk assessment for

- persons with intermediate and reduced penetrance alleles in Huntington disease. *Am J Med Genet*, 2001. **105**(8): p. 737-44.
16. Li, H., S.H. Li, Z.X. Yu, P. Shelbourne, and X.J. Li, Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice. *J Neurosci*, 2001. **21**(21): p. 8473-81.
  17. Koroshetz, W.J., B.G. Jenkins, B.R. Rosen, and M.F. Beal, Energy Metabolism Defects in Huntington's Disease and Effects of Coenzyme Q10. *Ann Neurol* 1997. **41**: p. 160-165.
  18. Maat-Kievit, J.A., M. Losekoot, and R.A. Roos, [From gene to disease; HD gene and Huntington disease]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 2001. **145**(44): p. 2120-3.
  19. Shibata, M., T. Lu, T. Furuya, A. Degterev, N. Mizushima, T. Yoshimori, M. MacDonald, B. Yankner, and J. Yuan, Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. *J Biol Chem*, 2006. **281**(20): p. 14474-85.
  20. Atkinson, R.C., G. Lindzey, and R.F. Thompson, *The Brain. A Neuroscience primer*, ed. 21996: Freeman and Company.
  21. Bates, G.P., History of genetic disease: the molecular genetics of Huntington disease - a history. *Nat Rev Genet*, 2005. **6**(10): p. 766-73.
  22. Ma, B., B.P. Culver, G. Baj, E. Tongiorgi, M.V. Chao, and N. Tanese, Localization of BDNF mRNA with the Huntington's disease protein in rat brain. *Mol Neurodegener*, 2010. **5**: p. 22.
  23. Cepeda, C., M.A. Ariano, C.R. Calvert, J. Flores-Hernandez, S.H. Chandler, B.R. Leavitt, M.R. Hayden, and M.S. Levine, NMDA receptor function in mouse models of Huntington disease. *J Neurosci Res*, 2001. **66**(4): p. 525-39.
  24. Choo, Y.S., G.V. Johnson, M. MacDonald, P.J. Detloff, and M. Lesort, Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**(14): p. 1407-20.
  25. Sadagurski, M., Z. Cheng, A. Rozzo, I. Palazzolo, G.R. Kelley, X. Dong, D. Krainc, and M.F. White, IRS2 increases mitochondrial dysfunction and oxidative stress in a mouse model of Huntington disease. *J Clin Invest*, 2011. **121**(10): p. 4070-81.
  26. Bao, J., A.H. Sharp, M.V. Wagsterv, M. Bechert, G. Schilling, C.A. Ross, V.L. Dawson, and T.M. Dawson, Expansion of polyglutamine repeat in huntingtin leads to abnormal protein interactions involving calmodulin. *Neurobiology*, 1996. **93**: p. 5037-5042.
  27. Cummings, D.M., C. Cepeda, and M.S. Levine, Alterations in striatal synaptic transmission are consistent across genetic mouse models of Huntington's disease. *ASN Neuro*, 2010. **2**(3): p. e00036.
  28. Ramaswamy, S., J.L. McBride, and J.H. Kordower, Animal models of Huntington's disease. *ILAR J*, 2007. **48**(4): p. 356-73.
  29. Wang, C.E., S. Tydlacka, A.L. Orr, S.H. Yang, R.K. Graham, M.R. Hayden, S. Li, A.W. Chan, and X.J. Li, Accumulation of N-terminal mutant huntingtin in mouse and monkey models implicated as a pathogenic mechanism in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 2008. **17**(17): p. 2738-51.

30. Dragatsis, I., M.S. Levine, and S. Zeitlin, Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat Genet*, 2000. **26**(3): p. 300-6.
31. Rosenstock, T.R., A.I. Duarte, and A.C. Rego, Mitochondrial-associated metabolic changes and neurodegeneration in Huntington's disease - from clinical features to the bench. *Curr Drug Targets*, 2010. **11**(10): p. 1218-36.
32. Landles, C., K. Sathasivam, A. Weiss, B. Woodman, H. Moffitt, S. Finkbeiner, B. Sun, J. Gafni, L.M. Ellerby, Y. Trotter, W.G. Richards, A. Osmand, P. Paganetti, and G.P. Bates, Proteolysis of mutant huntingtin produces an exon 1 fragment that accumulates as an aggregated protein in neuronal nuclei in Huntington disease. *J Biol Chem*, 2010. **285**(12): p. 8808-23.
33. Perry, T.L., S. Hansen, and M. Kloster, Huntington's chorea. Deficiency of gamma-aminobutyric acid in brain. *N Engl J Med*, 1973. **288**(7): p. 337-42.
34. Vauzour, D., K. Vafeiadou, A. Rodriguez-Mateos, C. Rendeiro, and J.P. Spencer, The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutr*, 2008. **3**(3-4): p. 115-26.
35. Fadeel, B. and S. Orrenius, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med*, 2005. **258**(6): p. 479-517.
36. Hengartner, M.O., The biochemistry of apoptosis. *Nature Neuroscience*, 2000. **407**: p. 770-776.
37. Portt, L., G. Norman, C. Clapp, M. Greenwood, and M.T. Greenwood, Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(1): p. 238-59.
38. Debatin, K.-M., Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*, 2004. **53**: p. 153-159.
39. Calissano, P., C. Matrone, and G. Amadoro, Apoptosis and in vitro Alzheimer disease neuronal models. *Communicative & Integrative Biology*, 2009. **2**(2): p. 163-169.
40. Broughton, B.R., D.C. Reutens, and C.G. Sobey, Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*, 2009. **40**(5): p. e331-9.
41. Budihardjo, I., H. Oliver, M. Lutter, X. Luo, and X. Wang, Biochemical pathways of caspase. Activation during apoptosis. *Cell dev. Biol.*, 1999. **15**: p. 269-290.
42. Alberts, B., D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Essential Cell Biology: an introduction to the molecular biology of the cell* 1998, New York: Garland publishing.
43. Bobba, A., V.A. Petragallo, E. Marra, and A. Atlante, Alzheimer's proteins, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction interplay in a neuronal model of Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*, 2010. **2010**.
44. Andreas Strasser, L.O.C., Vishva M. Dixit, APOPTOSIS SIGNALING. *Annu. Rev. Biochem.* , 2000. **69**: p. 217-245.
45. Conradt, B., Genetic control of programmed cell death during animal development. *Annu Rev Genet*, 2009. **43**: p. 493-523.

46. Shi, Y., Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Molecular Cell*, 2002. **9**: p. 459–470.
47. Naismith, J.H. and S.R. Sprang, Modularity in the TNF.receptor family. *Elsevier Science* 1998. **97**: p. 74-78.
48. Guildo Kroemer, L. Galluzzi, and C. Brenner, Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *American Physiological Society*, 2007. **87**: p. 99–163.
49. Daniel, P., T. Wieder, S. I., and K.S. Osthoff, The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Nature* 2001 **15**: p. 1022-1032.
50. Georg Häcker, A.W., BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2007. **462**: p. 150–155.
51. Johri, A. and M.F. Beal, Hunting-ton for new proteases: MMPs as the new target? *Neuron*, 2010. **67**(2): p. 171-3.
52. Petros, A.M., E.T. Olejniczak, and S.W. Fesik, Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1644**(2-3): p. 83-94.
53. Chunying Du, M.F., Yucheng Li, Lily Li, Xiaodong Wang, Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell*, 2000. **102**: p. 33-42.
54. Paul G. Ekert, J.S., Christine J. Hawkins, Anne M. Verhagen, David L. Vaux, DIABLO Promotes Apoptosis by Removing MIHA/XIAP from Processed Caspase 9. *Cell Biology*, 2001. **152**(3): p. 483–490.
55. Liu, X., H. Zou, P. Widlak, W. Garrard, and X. Wang, Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. *J Biol Chem*, 1999. **274**(20): p. 13836-40.
56. Liu, X., P. Li, P. Widlak, H. Zou, X. Luo, W.T. Garrard, and X. Wang, The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(15): p. 8461-6.
57. de Vries, E.G., J.A. Gietema, and S. de Jong, Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand pathway and its therapeutic implications. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(8): p. 2390-3.
58. Nicholson, D.W. and N.A. Thornberry, Caspases: killer proteases. *Elsevier Science*, 1997. **97**: p. 299-306.
59. Cha, J.-H.J., Transcriptional Signatures in Huntington's Disease. *Prog Neurobiol.* , 2007. **83**(4): p. 228-248.
60. Boatright, K.M. and G.S. Salvesen, Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*, 2003. **15**(6): p. 725-731.

61. Jäger, R. and R.M. Zwacka, The Enigmatic Roles of Caspases in Tumor Development. *Cancers*, 2010. **2**(4): p. 1952-1979.
62. Boris Turk, V.S., Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS Letters* 2007. **581** p. 2761–2767.
63. Fuentes-Prior, P. and G.S. Salvesen, The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* , 2004. **384**: p. 201–232
64. Wyllie, A.H., “Where, O Death, Is Thy Sting?” A Brief Review of Apoptosis Biology. *Mol Neurobiol*, 2010. **42**: p. 4–9.
65. Borner, C., The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology* 2003. **39**: p. 615-647.
66. Gross, A., J.M. McDonnell, and S.J. Korsmeyer, BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes and Development*, 1999. **13**: p. 1899-1911.
67. Ameeta Kelekar , C.B.T., Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *CELL BIOLOGY* 1998. **8**
68. Gafni, J. and L.M. Ellerby, Calpain Activation in Huntington’s Disease. *The Journal of Neuroscience*, 2002. **22**(12): p. 4842-4849.
69. Chen, M., V.O. Ona, M. Li, R. Ferrante, K.B. Fink, S. Zhu, J. Bian, L. Guo, L.A. Farrell, S.M. Hersch, W. Hobbs, J.-P. Vonsattel, J.-H.J. Cha, and R.M. Friedlander, Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nature Medicine*, 2000. **6**(7): p. 797- 801.
70. Sanchez, I.X., Chi-Jie; Juo, Peter; Kakizaka, Akira; Blenis, John; Yuan, Junying, Caspase-8 Is Required for Cell Death Induced by Expanded Polyglutamine Repeats. *Neuron*, 1999. **22**: p. 623-633.
71. Warby, S.C., C.N. Doty, R.K. Graham, J.B. Carroll, Y.Z. Yang, R.R. Singaraja, C.M. Overall, and M.R. Hayden, Activated caspase-6 and caspase-6-cleaved fragments of huntingtin specifically colocalize in the nucleus. *Hum Mol Genet*, 2008. **17**(15): p. 2390-404.
72. Graham, R.K., Y. Deng, E.J. Slow, B. Haigh, N. Bissada, G. Lu, J. Pearson, J. Shehadeh, L. Bertram, Z. Murphy, S.C. Warby, C.N. Doty, S. Roy, C.L. Wellington, B.R. Leavitt, L.A. Raymond, D.W. Nicholson, and M.R. Hayden, Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell*, 2006. **125**(6): p. 1179-91.
73. Turrens, J.F., Mitochondrial formation of reative oxygen species. *J Physiol*, 2003. **552**(Pt 2): p. 335-44.
74. Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. **39**(1): p. 44-84.
75. Singh, R.P., S. Sharad, and S. Kapur, Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine*, 2004. **5**(3): p. 218-225.

76. Pollack, M. and C. Leeuwenburgh, Molecular mechanisms of oxidative stress in aging: free radicals, aging, antioxidants and disease, in *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*, L.P.a.O.H. C.K. Sen, editors., Editor 1999. p. 881-922.
77. Meister, A. and M.E. Anderson, Glutathione. *Annu Rev Biochem*, 1983. **52**: p. 711-60.
78. Thannickal, V. and B.L. Fanburg, Reactive oxygen species in cell signaling. *Cell Mol Physiol*, 2000. **279**.
79. Turrens, J.F., Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 2003. **552**(Pt 2): p. 335-44.
80. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*, 1984. **219**(1): p. 1-14.
81. Aruoma, O.I., Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *JAOCS*, 1998. **75**(2): p. 200-212.
82. Liu, Y. and D.R. Schubert, The specificity of neuroprotection by antioxidants. *J Biomed Sci*, 2009. **16**: p. 98.
83. Tsu-Kung, L., L. Cha-Wei, C. Shang-Der , C. Yao-Chung, T. Mao-Meng, W. Pei-Wen, C. Jin-Bor , and C. Jiin-Haur, Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Chang Gung Med J*, 2009. **32**(6): p. 589-599.
84. Milakovic, T. and G.V. Johnson, Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *J Biol Chem*, 2005. **280**(35): p. 30773-82.
85. Seong, I.S., E. Ivanova, J.M. Lee, Y.S. Choo, E. Fossale, M. Anderson, J.F. Gusella, J.M. Laramie, R.H. Myers, M. Lesort, and M.E. MacDonald, HD CAG repeat implicates a dominant property of huntingtin in mitochondrial energy metabolism. *Hum Mol Genet*, 2005. **14**(19): p. 2871-80.
86. Panov, A.V., C.-A. Gutekunst, B.R. Leavitt, M.R. Hayden, J.R. Burke, W.J. Strittmatter, and J.T. Greenamyre, Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nature Neuroscience*, 2002.
87. Squitieri, F., M. Cannella, G. Sgarbi, V. Maglione, A. Falleni, P. Lenzi, A. Baracca, G. Cislighi, C. Saft, G. Ragona, M.A. Russo, L.M. Thompson, G. Solaini, and F. Fornai, Severe ultrastructural mitochondrial changes in lymphoblasts homozygous for Huntington disease mutation. *Mech Ageing Dev*, 2006. **127**(2): p. 217-20.
88. Liu, C.S., W.L. Cheng, S.J. Kuo, J.Y. Li, B.W. Soong, and Y.H. Wei, Depletion of mitochondrial DNA in leukocytes of patients with poly-Q diseases. *J Neurol Sci*, 2008. **264**(1-2): p. 18-21.
89. Heim, K.E., A.R. Tagliaferro, and D.J. Bobilya, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002. **13**(10): p. 572-584.
90. Villanueva, C. and R.D. Kross, Antioxidant-Induced Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012. **13**(2): p. 2091-2109.
91. Brewer, M.S., Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2011. **10**(4): p. 221-247.

92. Beal, M.F., Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol*, 1995. **38**: p. 357-366.
93. Cadet, J.L., Free radical mechanisms in the central nervous system: an overview. *Int J Neurosci.*, 1988. **40**(1-2): p. 13-18.
94. Chance, B. and H.B. Sies, A., Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 1979. **59**: p. 527-605.
95. Celik, H. and M. Kosar, Inhibitory effects of dietary flavonoids on purified hepatic NADH-cytochrome b5 reductase: Structure-activity relationships. *Chem Biol Interact*, 2012. **197**(2-3): p. 103-9.
96. Williams, R.J., J.P. Spencer, and C. Rice-Evans, Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med*, 2004. **36**(7): p. 838-49.
97. Shirley, B.W., Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology*, 2001. **126**: p. pp. 485-493.
98. Seixas, R.S.G.R., D.C.G.A. Pinto, A.M.S. Silva, and J.A.S. Cavaleiro, Synthesis of Novel 3-Alkyl-3',4',5,7-Tetrahydroxyflavones. *Aust. J. Chem.*, 2008. **61**: p. 718-724.
99. Andersen, Ø.M. and K.R. Markham, Flavonoids. , in *Chemistry, Biochemistry and Applications*, T.F. Group, Editor 2006: London. p. 617-623.
100. Nijveldt, R.J., E.v. Nood, D.E.v. Hoorn, P.G. Boelens, K.v. Norren, and P.A.v. Leeuwen, Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Society for Clinical Nutrition*, 2001. **74**: p. 418-425.
101. Seelinger, G., I. Merfort, U. Wolfle, and C.M. Schempp, Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin. *Molecules*, 2008. **13**(10): p. 2628-51.
102. Lepiniec, L., I. Debeaujon, J.M. Routaboul, A. Baudry, L. Pourcel, N. Nesi, and M. Caboche, Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu Rev Plant Biol*, 2006. **57**: p. 405-30.
103. Filipe, P., A.M. Silva, R.S. Seixas, D.C. Pinto, A. Santos, L.K. Patterson, J.N. Silva, J.A. Cavaleiro, J.P. Freitas, J.C. Maziere, R. Santos, and P. Morliere, The alkyl chain length of 3-alkyl-3',4',5,7-tetrahydroxyflavones modulates effective inhibition of oxidative damage in biological systems: illustration with LDL, red blood cells and human skin keratinocytes. *Biochem Pharmacol*, 2009. **77**(6): p. 957-64.
104. Gomes, A., O. Neuwirth, M. Freitas, D. Couto, D. Ribeiro, A.G. Figueiredo, A.M. Silva, R.S. Seixas, D.C. Pinto, A.C. Tome, J.A. Cavaleiro, E. Fernandes, and J.L. Lima, Synthesis and antioxidant properties of new chromone derivatives. *Bioorg Med Chem*, 2009. **17**(20): p. 7218-26.
105. Ansari, M.A., H.M. Abdul, G. Joshi, W.O. Opii, and D.A. Butterfield, Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta(1-42): relevance to Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem*, 2009. **20**(4): p. 269-75.
106. Loke, W.M., J.M. Proudfoot, S. Stewart, A.J. McKinley, P.W. Needs, P.A. Kroon, J.M. Hodgson, and K.D. Croft, Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids

- such as quercetin: lack of association between antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. *Biochem Pharmacol*, 2008. **75**(5): p. 1045-53.
107. Schroeter, H., J.P. Spencer, C. Rice-Evans, and R.J. Williams, Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem J*, 2001. **358**(Pt 3): p. 547-57.
  108. Martens, S.M., A., Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, 2005. **66**: p. 2399-2407.
  109. Marder, M., G. Estiu, L.B. Blanch, H. Viola, C. Wasowski, J.H. Medina, and A.C. Paladini, Molecular modeling and QSAR analysis of the interaction of flavone derivatives with the benzodiazepine binding site of the GABA(A) receptor complex. *Bioorg Med Chem*, 2001. **9**(2): p. 323-35.
  110. Winkel-Shirley, B., Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol*, 2001. **126**(2): p. 485-93.
  111. Harborne, J.B.B., H., *Handbook of Natural Flavonoids*, W. Chichester, Editor 1999.
  112. Herman, K., Flavonols and flavones in food plants: a review. *Journal of Food Technology*, 1976. **11**: p. 433-448.
  113. Lin, Y., R. Shi, X. Wang, and H.-M. Shen, Luteolin, a flavonoid with potentials for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets.*, 2008. **8**(7): p. 634-646.
  114. Dirscherl, K., M. Karlstetter, S. Ebert, D. Kraus, J. Hlawatsch, Y. Walczak, C. Moehle, R. Fuchshofer, and T. Langmann, Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique anti-inflammatory and neuroprotective phenotype. *J Neuroinflammation*, 2010. **7**: p. 3.
  115. Duan, K., Z. Yuan, W. Guo, Y. Meng, Y. Cui, D. Kong, L. Zhang, and N. Wang, LC-MS/MS determination and pharmacokinetic study of five flavone components after solvent extraction/acid hydrolysis in rat plasma after oral administration of *Verbena officinalis* L. extract. *J Ethnopharmacol*, 2011. **135**(2): p. 201-8.
  116. Miralem, T., N. Lerner-Marmarosh, P.E. Gibbs, C. Tudor, F.K. Hagen, and M.D. Maines, The human biliverdin reductase-based peptide fragments and biliverdin regulate protein kinase Cdelta activity: the peptides are inhibitors or substrate for the PKC. *J Biol Chem*, 2012.
  117. Hanawa, N., M. Shinohara, B. Saberi, W.A. Gaarde, D. Han, and N. Kaplowitz, Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *J Biol Chem*, 2008. **283**(20): p. 13565-77.
  118. Jang, S., R.N. Dilger, and R.W. Johnson, Luteolin inhibits microglia and alters hippocampal-dependent spatial working memory in aged mice. *J Nutr*, 2010. **140**(10): p. 1892-8.
  119. Comte, G., J.B. Daskiewicz, C. Bayet, G. Conseil, A. Viornery-Vanier, C. Dumontet, A. Di Pietro, and D. Barron, C-Isoprenylation of flavonoids enhances binding affinity toward P-glycoprotein and modulation of cancer cell chemoresistance. *J Med Chem*, 2001. **44**(5): p. 763-8.
  120. Luscombe, P.R.T.M., A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer*, 1987(56): p. 279-285.



121. Le, A., C.R. Cooper, A.M. Gouw, R. Dinavahi, A. Maitra, L.M. Deck, R.E. Royer, D.L. Vander Jagt, G.L. Semenza, and C.V. Dang, Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(5): p. 2037-42.
122. Tarpey, M.M., D.A. Wink, and M.B. Grisham, Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004. **286**(3): p. R431-44.
123. Kotamraju, S., Y. Tampo, S.V. Kalivendi, J. Joseph, C.R. Chitambar, and B. Kalyanaraman, Nitric oxide mitigates peroxide-induced iron-signaling, oxidative damage, and apoptosis in endothelial cells: role of proteasomal function? *Arch Biochem Biophys*, 2004. **423**(1): p. 74-80.
124. Perez-Navarro, E., N. Gavaldà, E. Gratacos, and J. Alberch, Brain-derived neurotrophic factor prevents changes in Bcl-2 family members and caspase-3 activation induced by excitotoxicity in the striatum. *J Neurochem*, 2005. **92**(3): p. 678-91.
125. Kang, S.S., J.Y. Lee, Y.K. Choi, G.S. Kim, and B.H. Han, Neuroprotective effects of flavones on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004. **14**(9): p. 2261-4.
126. Zhao, G., C. Yao-Yue, G.W. Qin, and L.H. Guo, Luteolin from Purple Perilla mitigates ROS insult particularly in primary neurons. *Neurobiol Aging*, 2012. **33**(1): p. 176-86.
127. Silva, J.P., A.C. Gomes, and O.P. Coutinho, Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *Eur J Pharmacol*, 2008. **601**(1-3): p. 50-60.
128. Sack, G.H., Jr., Mitochondrial matters in Huntington disease. *J Bioenerg Biomembr*, 2010. **42**(3): p. 189-91.
129. Ferreira, I.L., M.V. Nascimento, M. Ribeiro, S. Almeida, S.M. Cardoso, M. Grazina, J. Pratas, M.J. Santos, C. Januario, C.R. Oliveira, and A.C. Rego, Mitochondrial-dependent apoptosis in Huntington's disease human cybrids. *Exp Neurol*, 2010. **222**(2): p. 243-55.
130. Rosenstock, T.R., O.M. de Brito, V. Lombardi, S. Louros, M. Ribeiro, S. Almeida, I.L. Ferreira, C.R. Oliveira, and A.C. Rego, FK506 ameliorates cell death features in Huntington's disease striatal cell models. *Neurochem Int*, 2011. **59**(5): p. 600-9.
131. Chafekar, S.M. and M.L. Duennwald, Impaired heat shock response in cells expressing full-length polyglutamine-expanded huntingtin. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e37929.
132. Xifro, X., J.M. Garcia-Martinez, D. Del Toro, J. Alberch, and E. Perez-Navarro, Calcineurin is involved in the early activation of NMDA-mediated cell death in mutant huntingtin knock-in striatal cells. *J Neurochem*, 2008. **105**(5): p. 1596-612.
133. Sanchez, I., C.-J. Xu, P. Juo, A. Kakizaka, J. Blenis, and J. Yuan, Caspase-8 Is Required for Cell Death Induced by Expanded Polyglutamine Repeats. *Neuron*, 1999. **22**: p. 623-633.
134. Ona, V.O., M. Li, J.P. Vonsattel, L.J. Andrews, S.Q. Khan, W.M. Chung, A.S. Frey, A.S. Menon, X.J. Li, P.E. Stieg, J. Yuan, J.B. Penney, A.B. Young, J.H. Cha, and R.M. Friedlander, Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature*, 1999. **399**(6733): p. 263-7.

135. Chafekar, S.M., S. Wisen, A.D. Thompson, A. Echeverria, G.M. Walter, C.G. Evans, L.N. Makley, J.E. Gestwicki, and M.L. Duennwald, Pharmacological Tuning of Heat Shock Protein 70 Modulates Polyglutamine Toxicity and Aggregation. *ACS Chem Biol*, 2012.
136. Artus, C., H. Boujrad, A. Bouharrou, M.N. Brunelle, S. Hoos, V.J. Yuste, P. Lenormand, J.C. Rousselle, A. Namane, P. England, H.K. Lorenzo, and S.A. Susin, AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX. *EMBO J*, 2010. **29**(9): p. 1585-99.
137. Pavlica, S. and R. Gebhardt, Protective effects of flavonoids and two metabolites against oxidative stress in neuronal PC12 cells. *Life Sci*, 2010. **86**(3-4): p. 79-86.
138. Rezai-Zadeh, K., J. Ehrhart, Y. Bai, P.R. Sanberg, P. Bickford, J. Tan, and R.D. Shytle, Apigenin and luteolin modulate microglial activation via inhibition of STAT1-induced CD40 expression. *J Neuroinflammation*, 2008. **5**: p. 41.
139. Saija, A., M. Scalese, M. Lanza, D. Marzullo, F. Bonina, and F. Castelli, Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med*, 1995. **19**(4): p. 481-6.
140. Arora, A., M.G. Nair, and G.M. Strasburg, Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic Biol Med*, 1998. **24**(9): p. 1355-63.
141. Silva, M.M., M.R. Santos, G. Caroco, R. Rocha, G. Justino, and L. Mira, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. *Free Radic Res*, 2002. **36**(11): p. 1219-27.
142. Ruweler, M., A. Anker, M. Gulden, E. Maser, and H. Seibert, Inhibition of peroxide-induced radical generation by plant polyphenols in C6 astrogloma cells. *Toxicol In Vitro*, 2008. **22**(5): p. 1377-81.
143. Cheng, H.Y., M.T. Hsieh, F.S. Tsai, C.R. Wu, C.S. Chiu, M.M. Lee, H.X. Xu, Z.Z. Zhao, and W.H. Peng, Neuroprotective effect of luteolin on amyloid beta protein (25-35)-induced toxicity in cultured rat cortical neurons. *Phytother Res*, 2010. **24 Suppl 1**: p. S102-8.
144. Bournival, J., M.A. Francoeur, J. Renaud, and M.G. Martinoli, Quercetin and Sesamin Protect Neuronal PC12 Cells from High-Glucose-Induced Oxidation, Nitrosative Stress, and Apoptosis. *Rejuvenation Res*, 2012.
145. Bournival, J., P. Quessy, and M.G. Martinoli, Protective effects of resveratrol and quercetin against MPP<sup>+</sup>-induced oxidative stress act by modulating markers of apoptotic death in dopaminergic neurons. *Cell Mol Neurobiol*, 2009. **29**(8): p. 1169-80.
146. Ruan, Q., M. Lesort, M.E. MacDonald, and G.V. Johnson, Striatal cells from mutant huntingtin knock-in mice are selectively vulnerable to mitochondrial complex II inhibitor-induced cell death through a non-apoptotic pathway. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**(7): p. 669-81.